

SÉRIE A, N° 1877

N° D'ORDRE 2744

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

V. CHORINE

1^{re} THÈSE. — PERMÉABILITÉ GLOBULAIRE ET DOSAGE DES ÉLÉMENTS DU SANG.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Mai 1939 devant la Commission d'Examen.

20 MAI 1939

MM. JAVILLIER . . . *Président.*

WURMSER . . . }
MONNIER . . . } *Examineurs.*

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

1939

SÉRIE A, N° 1877

N° D'ORDRE : 2744

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

V. CHORINE

1^{re} THÈSE. — PERMÉABILITÉ GLOBULAIRE ET DOSAGE DES ÉLÉMENTS DU SANG.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Mai 1939 devant la Commission d'Examen.

MM. JAVILLIER . . . *Président.*

WURMSER . . . }
MONNIER . . . } *Examineurs.*

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

4, RUE CASSETTE, 4

1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Professeurs honoraires.

H. LEBESGUE.	AUGER.	PORTIER.	LÉON BERTRAND.
Émile PICARD.	BLAISE.	MOLLIARD.	WINTREBERT.
LÉON BRILLOUIN.	DANGEARD	LAPICQUE.	DUBOSQ.
GUILLET.	LESPLEAU.	G. BERTRAND.	BOHN.
PÉCHARD.	MARCHIS.	ABRAHAM.	RABAUD.
FREUNDLER.	VESIOT.	Ch. FABRY.	

PROFESSEURS

M. CAULLERY. T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
Émile BOREL. T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	PAUTHENIER	Physique (P. C. B.).
Jean PERRIN. T	Chimie physique.	De BROGLIE T	Théories physiques.
E. CARTAN. T	Géométrie supérieure.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
A. COTTON. T	Recherches physiques.	P. JOB.	Chimie générale.
J. DRACH T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LABROUSTE.	Physique du Globe.
Charles PÉREZ. T	Zoologie.	PRENANT. T	Anatomie et histologie comparées.
M. GUICHARD.	Chimie minérale.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
Paul MONTEL. T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	COMBES T	Physiologie végétale.
L. BLARINGHEM. T	Botanique.	GARNIER. T	Mathématiques générales.
G. JULIA. T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	PÉRÈS.	Mécanique théorique des fluides.
C. MAUGUIN T	Minéralogie.	HACKSPILL.	Chimie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY T	Pétrographie.	LAUGIER. T	Physiologie générale.
N.	Mécanique expérimentale des fluides.	TOUSSAINT.	Technique Aéronautique.
A. DENJOY. T	Application de l'analyse à la Géométrie.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
L. LUTAUD. T	Géographie physique de géologie dynamique.	G. RIBAUD. T	Hautes températures.
Eugène BLOCH. T	Physique.	CHAZY. T	Mécanique rationnelle.
G. BRUHAT.	Physique théorique et physique céleste.	GAULT.	Chimie (P. C. B.).
E. DARMOIS T	Enseignement de Physique.	CROZE.	Recherches physiques.
A. DEBIERNE T	Physique générale et Radioactivité.	DUPONT. T	Théories chimiques.
A. DUFOUR. T	Physique (P. C. B.).	LANQUINE T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
L. DUNOYER	Optique appliquée.	VALIRON.	Mathématiques générales.
A. GUILLIERMOND T	Botanique.	BARRABÉ.	Géologie structurale et géologie appliquée.
M. JAVILLIER. T	Chimie biologique.	MILLOT	Biologie animale (P. C. B.).
ROBERT-LÉVY. T	Physiologie comparée.	F. PERRIN.	Théories physiques.
F. PICARD	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	VAVON.	Chimie organique.
Henri VILLAT T	Mécanique des fluides et applications.	G. DARMOIS	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
Ch. JACOB. T	Géologie.	CHATTON. T	Biologie maritime.
P. PASCAL. T	Chimie minérale.	AUBEL.	Chimie biologique.
M. FRÉCHET T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	Jacques BOURCART.	Géographie physique et Géologie dynamique.
E. ESCLANGON T	Astronomie.	M ^{me} JOLIOT-CURIE.	Physique générale et Radioactivité.
M ^{me} RAMANT-LUCAS. T	Chimie organique.	PLANTEFOL.	Biologie végétale (P. C. B.).
H. BÉGHIN. T	Mécanique physique et expérimentale.	CABANNES	Enseignement de Physique.
		GRASSÉ	Biologie animale (P. C. B.).
		PRÉVOST.	Chimie (P. C. B.).
		BOULIGANT.	Mathématiques.

Secrétaire. A. PACAUD.
Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MON MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE MARCHOUX

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

*En signe de ma grande admiration et
ma profonde reconnaissance.*

PERMÉABILITÉ GLOBULAIRE ET DOSAGE DES ÉLÉMENTS DU SANG

PREMIÈRE PARTIE

1° Historique de la découverte des anticoagulants actuellement employés.

La découverte des anticoagulants a réalisé dans l'étude du sang, un progrès considérable, non seulement pour les recherches sur la coagulation, mais aussi pour l'étude des divers composants du sang et de leur répartition entre les globules et le plasma. Auparavant, la séparation du plasma était une manipulation délicate.

Delezenne, en 1896 [37], a fait ressortir l'influence du contact du sang avec les lèvres de la plaie sur la rapidité de la coagulation et il a vu que pour les vertébrés inférieurs, si l'on évite ce contact, on peut conserver très longtemps le sang incoagulé.

On sait aussi qu'on peut retarder la coagulation par l'action du froid, comme l'a montré déjà Hewson et ensuite Schmidt pour le sang de cheval [87 et 166].

Freund, en 1886 [55], a montré que l'utilisation de la verrerie vaselinée retarde sensiblement la coagulation du sang. Lilienfeld [116], en 1892, a eu l'idée de remplacer la vaseline par la paraffine, plus commode à manier. Bordet et Gengou, en 1902 [20], employèrent les tubes paraffinés pour la séparation du plasma.

Hammersten, en 1876 [76], a remarqué l'action favorisante

du chlorure de calcium sur la coagulation. Green en 1888 [63], a émis l'hypothèse que les sels de calcium sont indispensables dans ce processus. Ringer et Sansbury [159] ont démontré que les sels de strontium et de baryum, métaux de la même famille que le calcium, peuvent, jusqu'à un certain point, remplacer les sels de ce dernier.

En 1890, Arthus et Pagès [2 et 3] avancent beaucoup la question en montrant que la précipitation du calcium par l'oxalate, le fluorure ou des savons de métaux alcalins, empêche la coagulation du sang.

Les premiers anticoagulants agissant *in vitro* à doses faibles étaient donc des sels qui précipitent le calcium ou en diminuent la dissociation ionique.

Lumière et Couturier, en 1926 [120], indiquent l'action anticoagulante puissante du sulfate de zinc.

On connaissait de longue date l'action anticoagulante des divers sels minéraux utilisés à forte dose, Hewson [87] l'établit en 1777.

On a vu ensuite que presque tous les sels neutres peuvent entraver la coagulation, mais l'action de ces substances n'est pas tout à fait comparable à celle des anticoagulants précités. En effet, les sels neutres exigent l'emploi de doses très fortes et leur action se résume, au moins pour certains, à la précipitation du fibrinogène, protéide plus facilement précipitable par les sels neutres que les autres fractions protéidiques du sérum. L'action des sels des métaux lourds est comparable à celle des sels neutres des métaux alcalins ou alcalino-terreux ; ils précipitent même les protéides à des concentrations plus faibles que ces derniers.

Parmi les anticoagulants organiques, il faut citer l'hirudine. C'est Haycraft [81] qui montra que la morsure de sangsue suscite des hémorragies prolongées. Ce retard à la coagulation est dû à une substance soluble dans l'eau que cet auteur extrait à l'état impur. Bodang [48] a réussi à retirer des têtes de sangsues, 78 milligrammes d'un corps appelé hirudine. Un milligramme de cette substance empêche la coagulation de 30 cent. cubes de sang de lapin.

Howell, en 1923 [86], a isolé du foie de chien l'héparine,

très étudiée par Fischer et qui est un anticoagulant de plus en plus employé.

Enfin, le liquoïde qui est le polyanéthol-sulfonate de sodium, empêche la coagulation du sang. Il s'emploie fréquemment pour les recherches sur le plasma.

Plusieurs autres corps organiques possèdent la même activité, mais sont peu utilisés pour l'étude du sang. On peut citer : les mucates, les aconitates, les sulfosalicylates (A. Lumière), les dérivés sulfitiques des aminophénols (L. Launoy), la choline (Ed. Zunz et J. la Barre), le salvarsan, le moranyl qui est l'urée symétrique du métaminobenzoyl-métaminoparaméthylbenzoyl-1-naphtylamino 4-6-8 trisulfonate de sodium et son isomère.

L'utilisation des anticoagulants est très largement répandue dans les laboratoires pour les recherches les plus variées. Pendant longtemps on ne s'est pas occupé de l'action de ces substances sur le sang, en dehors de celle qu'on recherchait.

Cependant en 1894, Limbeck [417] a signalé que l'addition de sels au sang provoque un changement de volume globulaire. A la suite de quoi, nombreux ont été les travaux qui ont porté sur les variations du volume des globules rouges dans les milieux de tonicité différente. Les résultats ne sont pas toujours concordants. Les modifications du rapport du volume globulaire au volume plasmatique indiquent un changement dans la composition des globules rouges et du plasma, soit par échange d'eau, soit par échange d'autres corps. Il est évident que ces modifications doivent retentir sur les dosages des diverses substances chimiques, dosages que l'on pratique couramment sur les globules et le plasma.

Cette question, depuis quelques années attire de plus en plus l'attention des travailleurs et surtout des chimistes qui se sont aperçus que la répartition de diverses substances entre le plasma et les globules est modifiée par l'emploi des anticoagulants.

Ce phénomène, dont les auteurs ne se sont pas suffisamment préoccupés, introduit des contradictions dans les analyses des constituants du sang et dans leur répartition entre globules et plasma.

Nous allons premièrement exposer les résultats de nos expériences et ensuite passer en revue quelques-uns des travaux récents dans lesquels nous avons relevé l'action perturbatrice des anticoagulants sur le dosage des divers constituants du sang.

2° Introduction.

Nous avons été amené aux recherches qui font l'objet de ce travail par l'examen des résultats surprenants que nous a donnés une de nos expériences. Nous dosions les protéides du plasma et du sérum d'un même animal, en l'occurrence le lapin. Le sang a été prélevé par ponction carotidienne et séparé en deux parties : l'une a été oxalatée à raison de 5 p. 1.000, nous avons laissé coaguler l'autre pour avoir le sérum. Le plasma séparé par centrifugation a été analysé après quinze minutes de contact avec l'anticoagulant. L'analyse du sérum conservé à la glacière en tube bouché a eu lieu vingt-quatre heures après la prise de sang. Le taux des protéides a été obtenu par dosage de l'azote protéidique sur 2 cent. cubes de liquide en utilisant la microméthode de Kjeldahl. Le coefficient de transformation de l'azote en protéides a été pris égal à 6,25. Voici les résultats :

	PROTÉIDES du plasma oxalaté en grammes par litre	PROTÉIDES du sérum en grammes par litre	DIFFÉRENCES au détriment du plasma en grammes
Lapin n° 1	57,10	59,20	— 2,10
Lapin n° 2	61,20	63,70	— 2,50
Lapin n° 3	53,90	59,10	— 5,20
Lapin n° 4	57,30	59,80	— 2,50
Lapin n° 5	71,50	73,50	— 2,00
Lapin n° 6	65,80	67,90	— 2,10

Ainsi donc, dans tous ces dosages, le plasma s'est montré plus pauvre en protéides que le sérum. D'après les prévisions théoriques, les résultats devaient être inverses, une partie des protéides du plasma ayant disparu du sérum avec la fibrine coagulée qui reste dans le caillot.

La fibrine que l'on trouve dans le plasma des mammifères

à raison de 0,2 à 0,4 p. 100 contient, comme toutes les substances protéidiques, de l'azote et la teneur en est de 16,91 p. 100 [133].

Nous n'avons pas été les seuls à faire ces constatations. Gettler et Baker en 1916 [59], en comparant le taux de l'azote protéidique du plasma et du sérum d'un même sang ont remarqué que le plasma obtenu par centrifugation du sang oxalaté est plus pauvre en azote que le sérum.

Schmidt et Tuljtschinskaja en 1933 [168] ont fait les dosages d'azote total contenu dans le sérum et dans le plasma provenant d'un même sang. Le plasma a été obtenu par centrifugation du sang oxalaté à 10 p. 1.000. Toutes les analyses ont été pratiquées vingt-quatre heures après la prise de sang. Les sangs de l'homme, de chien, de mouton, de lapin et de cobaye ont été examinés avec des résultats sensiblement identiques. Le plasma s'est montré constamment plus pauvre, en moyenne de 6,26 p. 100 en azote protéidique que le sérum correspondant. Par fractionnement au sulfate d'ammonium, les auteurs ont précisé que la richesse du sérum en protéides est due à la plus forte teneur en albumine de celui-ci. Ils ne trouvent aucune explication à ce phénomène et suggèrent que la teneur plus forte du sérum en protéides est due à une formation d'albumine par le processus protéolytique et autolytique qui se produit au cours de la coagulation du sang (?).

D'autre part, Lehman et Scott [111], par dosages des protéides du plasma oxalaté, sans indication du taux d'oxalate, et du sérum des mêmes animaux : bœuf, chien, chat, ont trouvé que plasma et sérum contiennent sensiblement la même quantité de protéides. Pour expliquer cet excès relatif du sérum en protéides, ils admettent un passage réversible des protéides entre globules et plasma.

Nous avons pensé que l'anticoagulant utilisé dans ces expériences était la source des erreurs commises ; pour nous en assurer, nous avons fait le dosage du plasma séparé par centrifugation rapide de sang, non additionné d'anticoagulant, et celui du sérum provenant du même sang. Les résultats ainsi obtenus sont très différents de ceux que nous avons rapportés plus haut.

	PROTÉIDES du plasma frais en grammes par litre	PROTÉIDES du sérum en grammes par litre	DIFFÉRENCES en faveur du plasma	
			en gr. par litre	en p. 100
Lapin n° 1 .	56,90	52,20	+ 4,70	9,0
Lapin n° 2 .	55,80	50,50	+ 5,30	10,5
Lapin n° 3 .	67,20	57,80	+ 9,40	16,3
Lapin n° 4 .	57,60	51,30	+ 6,30	12,4
Lapin n° 5 .	66,10	61,40	+ 4,70	7,7

N'ont été utilisés que le sérum et le plasma non teints d'hémoglobine qui, en raison de sa richesse en azote, même en faible quantité, aurait faussé les résultats. Les chiffres ci-dessus indiquent que le plasma est en réalité plus riche en azote que le sérum ; les résultats inverses sont dus à l'emploi d'anticoagulants.

Les indications si différentes de ces deux séries d'expériences nous ont incité à en rechercher la cause.

3° Méthodes et matériel utilisés.

Nous avons commencé notre travail sur le sang du lapin et complété nos recherches sur celui de l'homme, du mouton et de la poule.

Pour nos premières expériences, nous opérions sur des animaux à jeun depuis vingt-quatre heures, mais nous nous sommes vite aperçu que cette précaution était inutile. Nos résultats restaient les mêmes, que l'animal ait mangé ou non, quelques heures avant la saignée.

PRISE DE SANG. — Elle a été pratiquée par ponction carotidienne chez le lapin et la poule. Pour ces opérations, nous avons suivi la technique de Borrel. Après incision cutanée sur la face antérieure du cou, on dénude la carotide et on la lie le plus haut possible. On place deux autres fils pour ligatures ultérieures et on fixe sur l'artère une pince en amont de l'endroit qu'on veut ponctionner. Avec une pipette Pasteur dont l'extrémité effilée est chauffée au rouge, on carbonise légèrement la paroi artérielle sur une surface de 1 ou 2 millimètres carrés. En ce point, qui n'offre plus de résistance, on

introduit la canule de Borrel préalablement paraffinée, avec son mandrin. On serre la ligature placée sur la canule pour éviter le suintement et on enlève la pince. Le mandrin est retiré et on rejette le premier jet de sang qui, ayant été en contact avec les lèvres de la plaie, se coagule plus rapidement. A la fin de la saignée on remet le mandrin, on lie l'artère, on retire la canule et on ferme la plaie.

La méthode de Borrel présente cet avantage que, grâce à la canule paraffinée, la coagulation du sang se trouve retardée. Quoique cette canule ait été conçue pour la saignée des poules, elle convient très bien aussi pour la ponction carotidienne du lapin, si on prend soin de la maintenir fixée par une ligature.

La prise de sang chez l'homme a été pratiquée par ponction veineuse avec une aiguille de Vernes. Nous avons fait chez le mouton la ponction de la veine jugulaire par la méthode habituelle.

DOSAGE DES PROTÉIDES. — Nous avons mesuré la quantité des protéides par le microdosage de l'azote protéidique par la méthode de Kjeldahl sur 1 cent. cube de sérum.

On sait que l'azote non protéidique du plasma, sauf quelques cas pathologiques, est en quantité très faible par rapport à l'azote protéidique ; plusieurs expérimentateurs négligent d'en tenir compte et l'erreur n'est guère appréciable. Cependant, nous avons, dans toutes nos expériences, éliminé l'azote non protéidique en précipitant les protéides par l'acide trichloracétique en opérant de la façon suivante. A 1 cent. cube de plasma ou de sérum mesuré avec une pipette à deux traits dans un tube à centrifugation en Pyrex de capacité de 40 cent. cubes, on ajoute 20 cent. cubes d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et on mélange bien. Après trente minutes de contact, on centrifuge. Le liquide surnageant est rejeté et le culot de protéides redissous dans 1 ou 2 cent. cubes d'eau distillée additionnée de quelques gouttes de NaOH N. La solution des protéides est transportée dans une fiole à microdosage de Kjeldahl, le tube de centrifugation est rincé à sept ou huit reprises avec de l'eau distillée alcalinisée et les eaux de lavage sont réunies dans la même fiole.

Pour détruire la matière organique, nous avons additionné les protéïdes contenues dans 1 cent. cube de sérum ou de plasma ainsi traité, de 2 cent. cubes d'acide sulfurique pur et concentré. Pour élever la température d'ébullition, on ajoute dans chaque fiole 1 gramme de sulfate de potassium pur pour analyse et comme catalyseur 0 gr. 10 de sulfate de cuivre, proportion que G. Bertrand indique comme optima. On évapore l'eau doucement et on procède à la combustion de la matière organique.

On sait que quand on arrête le chauffage juste après la décoloration, on n'obtient pas le maximum d'azote dosable : il faut chauffer toujours un peu plus. Cette prolongation du chauffage dépend non seulement de la substance à analyser, mais aussi du catalyseur employé. Nous avons suivi la recommandation de G. Bertrand [14] et recherché pour le sérum le temps de chauffage nécessaire après décoloration pour avoir le maximum d'azote dosable. Ordinairement ce temps ne dépasse pas soixante minutes après la décoloration. Voici les résultats d'une de nos expériences préliminaires sur 1 cent. cube de sérum de lapin.

TEMPS DE CHAUFFAGE après la décoloration	AZOTE TROUVÉ dans 1 cent. cube en milligrammes
0	10,39
30 minutes	10,78
60 minutes	10,85
1 heure 1/2	10,85
3 heures	10,85
6 heures	10,85
10 heures	10,78

On a donc le maximum d'azote au bout de soixante minutes. La prolongation du chauffage jusqu'à six heures n'altère pas les résultats.

On a proposé récemment le sélénium comme un catalyseur très actif permettant de diminuer le temps de destruction de la matière organique. Nous avons essayé ce catalyseur, qui est plus délicat à manier.

Dans l'expérience ci-dessous nous avons analysé 1 cent. cube de sérum de lapin en utilisant soit le sulfate de cuivre,

soit l'anhydride sélénieux comme catalyseur. La décoloration est sensiblement plus rapide avec le sélénium ; elle est déjà complète dix minutes après l'attaque, tandis qu'avec le sulfate de cuivre, la même opération demande de vingt à trente minutes.

TEMPS DE CHAUFFAGE après la décoloration	AZOTE TROUVÉ dans 1 cent. cube de sérum en milligrammes quand on utilise comme catalyseur	
	le sélénium	le sulfate de cuivre
0	9,40	9,40
15 minutes	9,38	9,21
30 minutes	9,52	9,38
1 heure	9,52	9,52
2 heures	9,50	9,52
3 heures	9,21	9,52
5 heures	8,75	9,52
7 heures	8,48	9,48

On voit qu'avec le sélénium la quantité maximum d'azote dosable est plus rapidement atteinte, mais déjà après deux heures de chauffage, la quantité d'azote commence à diminuer. Avec le sulfate de cuivre la quantité maxima d'azote dosable est atteinte soixante minutes après la décoloration, mais elle reste constante pendant plusieurs heures. Le gain de temps que donne le sélénium n'est pas d'une réelle importance, mais l'emploi en exige une surveillance étroite pour obtenir des résultats corrects ; c'est pour cette raison que nous avons adopté le sulfate de cuivre. Nous avons remarqué aussi que quand on fait les dosages en double, le sélénium donne plus souvent de petites différences entre les deux échantillons, tandis qu'avec le sulfate de cuivre les résultats restent beaucoup plus stables.

Le dosage de l'ammoniaque a été fait dans l'appareil à distillation avec entraînement de vapeur d'eau, modifié par de Saint-Rat. On a procédé au titrage de l'ammoniaque au fur et à mesure de la distillation, comme le conseille G. Bertrand, par l'emploi de la soude N/10 et d'une pipette graduée au vingtième de centimètre cube.

Le coefficient de 6,25 a été utilisé dans nos calculs pour transformer le poids d'azote en poids de protéides.

Tous nos dosages ont été faits en double. Pour toute différence dépassant 1 p. 100 nous avons répété le dosage.

Témoins. — Pour comparer l'action des anticoagulants, nous nous sommes servi de plasma recueilli dans des tubes *ad hoc* bien propres, et rapidement centrifugé à 5-6.000 tours-minute pendant cinq minutes. Pour préparer les tubes, après les avoir paraffinés et refroidis, on les plonge dans l'eau distillée pendant plusieurs heures pour éliminer les impuretés solubles dans l'eau qui pourraient se trouver incluses dans la paraffine et on les sèche avant usage à 37°. A condition d'aller vite, on peut se servir de tubes même non paraffinés sans que les résultats changent.

Nous avons négligé l'influence du départ de CO_2 quand le sang était mis au contact de l'air. Hamburger [71] a montré que les variations de la concentration de ce gaz dans le sang influent sur le volume globulaire. Dans nos recherches, tous les échantillons de sang recueillis pour une même expérience ont été maintenus dans les mêmes conditions de température et de pression, de telle sorte que la perte en CO_2 était sensiblement identique dans tous nos prélèvements.

VERRERIE UTILISÉE. — Les tubes utilisés ainsi que les pipettes doivent être très propres. Pour cela, après les avoir lavés au mélange sulfo-chromique et à l'eau, il est nécessaire de les plonger dans l'eau distillée pendant plusieurs heures pour éliminer toute trace de substances solubles dans l'eau. Ensuite on les sèche à l'étuve. Il faut éviter d'employer la verrerie stérilisée au four Pasteur, car souvent elle en sort avec des traces plus ou moins marquées de produits empyreumatiques provenant de la distillation du papier, du coton, etc... Dans toutes les expériences où nous n'avons pas eu besoin de conserver le sang, nous avons utilisé de la verrerie non stérilisée. Dans le cas contraire, nous avons stérilisé la verrerie soit à l'autoclave, soit même au four Pasteur, mais en veillant à la température pour que le coton en sorte à peine jaunâtre. Quand le temps nous le permettait, nous nous servions pour une même expérience de la même pipette lavée et séchée entre deux prises de plasma ou de sérum. La pro-

preté des tubes joue un rôle des plus importants ; la moindre impureté soluble dans l'eau fausse les résultats.

ANTICOAGULANTS UTILISÉS. — Nous avons employé l'oxalate neutre de potassium pur pour analyses R. P. (Rhône-Poulenc), le fluorure de sodium neutre pur Poulenc, le citrate de soude purifié de la maison R. P. et les mêmes corps provenant de la maison Merck à l'état très pur, sans observer aucune modification dans les résultats obtenus avec les produits français.

L'héparine, le liquoïde et l'hirudine étaient fournis par la maison Hoffmann-La Roche.

4° Tous les anticoagulants utilisés sous forme de poudre provoquent une diminution du taux des protéïdes du plasma.

Dans cette série d'expériences faites sur le sang de lapin, les anticoagulants ont été ajoutés sous forme de poudre au sang, le mélange bien agité et le plasma obtenu par centrifugation après quinze minutes de contact.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéïdes p. 100 par rapport aux témoins
EXPÉRIENCE N° 1. — Lapin à jeun depuis 24 heures.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	67,60	
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	62,10	— 8,1
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	60,95	— 9,8
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100.	57,20	— 15,4
EXPÉRIENCE N° 2.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	59,60	
Plasma du sang hirudiné à 0,05 p. 100	55,50	— 2,5
EXPÉRIENCE N° 3.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	61,10	
Plasma du sang hépariné à 0,015 p. 100	58,00	— 5,1

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
EXPÉRIENCE N° 4.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	70,40	
Plasma du sang liquoidé à 0,15 p. 100	63,90	— 9,2

On voit que tous ces anticoagulants provoquent une diminution plus ou moins importante du taux des protéides du plasma du lapin.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
Sang humain prélevé à jeun.		
EXPÉRIENCE N° 5.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	80,10	
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	69,30	— 13,5
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	71,80	— 10,4
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	65,80	— 17,9
Plasma du sang hépariné à 0,015 p. 100	78,40	— 2,1

Sang de poules.

EXPÉRIENCE N° 6.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	62,50	
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	51,90	— 17,0
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	53,20	— 14,9
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	55,30	— 11,5

Sang de mouton.

EXPÉRIENCE N° 7.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	84,2	
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	74,7	— 11,3
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	76,5	— 9,1
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	79,2	— 5,9

Le sang de l'homme et ceux de la poule et du mouton se comportent, vis-à-vis de l'anticoagulant, comme le sang du lapin,

5° La diminution du taux des protéïdes est fonction de la quantité d'anticoagulant ajoutée.

Cette série d'expériences est faite sur le sang de lapin dont le plasma est séparé au bout de quinze minutes après le mélange avec l'anticoagulant.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéïdes p. 100 par rapport aux témoins
EXPÉRIENCE N° 8.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	57,10	
Plasma du sang oxalaté à 0,1 p. 100	56,10	— 1,8
Plasma du sang oxalaté à 0,3 p. 100	54,70	— 4,2
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	49,20	— 13,8

EXPÉRIENCE N° 9.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	63,50	
Plasma du sang fluoré à 0,3 p. 100	58,20	— 8,3
Plasma du sang fluoré à 0,5 p. 100	56,90	— 10,4
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	54,40	— 14,3

EXPÉRIENCE N° 10.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	66,20	
Plasma du sang citraté à 0,4 p. 100	62,60	— 5,4
Plasma du sang citraté à 0,7 p. 100	60,10	— 9,2
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	59,60	— 10,0

Sang de mouton.

EXPÉRIENCE N° 11.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	84,2	
Plasma du sang fluoré à 0,5 p. 100	76,7	— 8,9
Plasma du sang fluoré à 1 p. 100	74,7	— 11,3

EXPÉRIENCE N° 12.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	84,2	
Plasma du sang oxalaté à 0,2 p. 100	81,2	— 3,6
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	79,8	— 5,2
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100	76,5	— 9,1

On voit que la diminution du taux de protéïdes est proportionnelle à la quantité d'anticoagulants ajouté.

**6° A des taux égaux d'anticoagulants,
les sangs de différentes espèces et même d'une même espèce
ne répondent pas identiquement.**

En voici quelques exemples pour le sang de lapin :

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéïdes p. 100 par rapport aux témoins
EXPÉRIENCE N° 13 AVEC L'OXALATE DE POTASSE.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	58,10	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	50,90	— 12,4
EXPÉRIENCE N° 14.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	57,10	
Plasma oxalaté à 0,5 p. 100	49,20	— 13,8
EXPÉRIENCE N° 15.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	58,20	
Plasma oxalaté à 0,5 p. 100	52,50	— 9,8
EXPÉRIENCE N° 16.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	69,80	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100	63,30	— 9,3
EXPÉRIENCE N° 17 AVEC LE CITRATE DE SOUDE.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	67,50	
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	62,10	— 8,0
EXPÉRIENCE N° 18.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin	66,20½	
Plasma du sang citraté à 1 p. 100	59,60	— 10,0

Avec le fluorure de sodium, on observe aussi des variations individuelles.

Les anticoagulants agissent donc proportionnellement à l'augmentation de la concentration moléculaire. C'est pourquoi les anticoagulants puissants tels que l'héparine ou l'hirudine, agissant à des doses très faibles, donnent une diminution moins marquée que les autres. D'autre part, les variations individuelles que présente le sang de chaque animal, rendent impossible la prévision exacte de l'ordre de grandeur du phénomène. D'ailleurs Eisenman [44], en étudiant la répartition des électrolytes dans le sang oxalaté et défibriné, remarque que l'action de l'oxalate sur cette répartition varie avec chaque échantillon de sang.

7° Utilisation d'anticoagulants en solution.

Tout ce que nous avons vu jusqu'à présent s'applique aux anticoagulants en poudre. Les phénomènes restent les mêmes quand on utilise les solutions hypertoniques d'anticoagulants. L'avantage des solutions est de ne pas provoquer la lyse des globules rouges qu'on observe avec une intensité plus ou moins grande, autour des anticoagulants en poudre.

Si nous employons une solution hypertonique d'un coagulant quelconque, nous ajoutons au sang une quantité de liquide qui ne nous permet plus une comparaison avec un sang additionné d'anticoagulant en poudre. Il nous faut donc, pour obtenir des résultats comparatifs, user de témoins additionnés du même anticoagulant en solution sensiblement isotonique.

PROTÉIDES en grammes par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
—	—

EXPÉRIENCE N° 19.

10 cent. cubes de sang + 2 cent. cubes d'oxalate isotonique à 2,35 p. 100.	51,20	
10 cent. cubes de sang + 2 cent. cubes d'oxalate à 10 p. 100	40,50	— 21,9

Des résultats analogues ont été observés avec le fluorure

et le citrate. Nous ne parlerons pas ici des solutions hypotoniques qui sont étudiées plus loin.

Des résultats plus intéressants sont à noter avec l'héparine. Nous avons vu qu'utilisée en poudre à dose active, elle ne donne que de faibles diminutions. En solution dans l'eau de 0,5 à 2,5 p. 100, il suffit d'en employer 0 c. c. 03 à 0 c. c. 2 pour 10 cent. cubes de sang pour éviter la coagulation. Les quantités de liquide ainsi ajoutées sont négligeables par rapport au volume du sang. Les nombreux dosages que nous avons pratiqués sur le plasma de sang de lapin ainsi hépariné nous ont donné des résultats exactement égaux à ceux qui ont été obtenus sur le plasma recueilli en tube paraffiné. Nous possédons donc, avec l'héparine utilisée en solution, un anticoagulant qui ne modifie pas pratiquement la concentration des protéides.

**8° La diminution du taux des protéides
ne se manifeste qu'en présence des globules rouges,
sauf pour le liquoïde.**

Nous avons cru tout d'abord que l'addition d'anticoagulants au sang amenait une précipitation des protéides plasmatiques et que l'addition d'un anticoagulant à un plasma clair mettrait en évidence. A cet effet, nous avons préparé l'expérience suivante.

Du sang de lapin est divisé en deux parties : l'une est recueillie dans un tube paraffiné et centrifugé immédiatement pour avoir le plasma frais. l'autre est recueillie dans un vase sur l'anticoagulant étudié. Le plasma frais, séparé des globules, est alors additionné du même anticoagulant à dose double de celle du sang total, de façon à compenser largement le volume globulaire qui dépasse rarement 40 p. 100 du sang total. Après la dissolution de l'anticoagulant, le plasma et le sang sont centrifugés.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
EXPÉRIENCE N° 20.		
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin.	63,50	
Plasma du sang fluoré à 0,5 p. 100	56,90	— 10,4
Plasma fluoré à 1 p. 100 après séparation. . .	63,80	+ 0,5

EXPÉRIENCE N° 21.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin.	66,20	
Plasma du sang citraté à 0,7 p. 100.	60,10	— 9,2
Plasma citraté à 1 p. 100 après séparation. .	66,40	— 0,15

EXPÉRIENCE N° 22.

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin.	57,00	
Plasma du sang oxalaté à 0,5 p. 100.	52,70	— 7,5
Plasma oxalaté à 1 p. 100 après séparation. .	57,30	+ 0,5

De même avec l'héparine, on ne provoque pas de variations du taux des protéides dépassant l'erreur d'expérience quand elle est ajoutée au plasma séparé des globules rouges.

Ainsi le plasma séparé des globules rouges ne perd pas de protéides par addition d'un anticoagulant. Mais il en est tout autrement quand, à ce plasma, on restitue les globules rouges qu'on en avait séparés. Dans ce cas, il se comporte comme le sang total.

EXPÉRIENCE N° 23. — On prélève, par ponction carotidienne, du sang de lapin. A 10 cent. cubes, on ajoute 0 gr. 05, soit 1/2 p. 100, d'oxalate de K en poudre. Le reste est recueilli dans un tube paraffiné et centrifugé rapidement. Le plasma séparé est oxalaté à 1 p. 100 pour compenser le volume des globules. On élimine le précipité d'oxalate de Ca par centrifugation et on en prélève 2 cent. cubes de plasma pour analyse. Il reste 7 cent. cubes qu'on remet sur les globules rouges provenant de la centrifugation des 20 cent. cubes de sang recueillis. On mélange bien et on laisse quinze minutes en contact. Après ce temps on sépare à nouveau le plasma par centrifugation ; voici les résultats :

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport aux témoins
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.	—	—
Témoin.	56,90	
Plasma oxalaté à 1 p. 100 après séparation des globules rouges et centrifugé	57,00	+ 0,18
Même plasma après passage sur les globules rouges	48,30	— 15,1

EXPÉRIENCE N° 24.

Avec le fluorure de Na nous avons :

Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.		
Témoin.	57,90	
Plasma fluoré à 10,8 p. 100 après séparation et centrifugé	57,90	0
Même plasma après passage sur les globules.	51,50	— 11,1

Sauf pour l'oxalate de potassium, on ne remarque aucun trouble appréciable dans le plasma après addition des anticoagulants précités. Utilisé jusqu'à la dose de 1 p. 100, l'oxalate ne détermine que la précipitation du Ca. A des doses plus fortes, il précipite aussi une partie des protéides.

Seul le liquoïde (Polyanéthol sulfonate de Na), à des doses qui sont à la limite de son activité anticoagulante, provoque un abondant précipité dans lequel est contenue une partie des protéides, comme l'indique l'expérience suivante :

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
Plasma du sang recueilli en tube paraffiné.	—	—
Témoin.	70,50	
Plasma liquoïdé à 0,25 p. 100 après séparation du précipité	69,20	— 1,8

Ainsi, sauf pour le liquoïde, il faut la présence des globules rouges pour amener une diminution des protéides. Ajoutons que, même pour le liquoïde, la diminution est beau-

coup plus grande quand il est additionné au sang total. Si nous avons vérifié qu'il ne se produit pas de précipitation des protéides dans le plasma, rien ne nous prouve que cette précipitation ne se produit pas dans le sang total.

ON PEUT REMPLACER LES GLOBULES ROUGES PAR DES LEVURES.

Quand nous parlons ici de globules rouges, nous faisons abstraction des globules blancs du sang qui interviennent sans doute dans le phénomène, mais qui sont en quantité négligeable. Reste à savoir s'il s'agit d'une question de masse ou d'une qualité spécifique. A cet effet, à du plasma nous ajoutons, par exemple, des levures préalablement lavées à plusieurs reprises pour enlever toutes les traces d'azote.

EXPÉRIENCE N° 26. — On centrifuge du sang de lapin dans un tube paraffiné. Une partie du plasma séparé est additionnée de fluorure de sodium à raison de 10 p. 1.000, l'autre d'héparine en solution à 0,75 p. 100 à raison de 150 milligrammes-litre. Une partie de chacun de ces plasmas est remise sur un volumineux culot de levure lavée préalablement à 4 reprises dans l'eau physiologique. La dernière eau de lavage contient 0 gr. 14 d'azote par litre.

	PROTÉIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
Plasma témoin, recueilli en tube paraffiné . .	70,9	—
Plasma fluoré après séparation des globules .	70,6	— 0,4
Plasma hépariné après séparation des globules.	70,8	— 0,44
Plasma fluoré remis sur les levures	67,0	— 5,1
Plasma hépariné remis sur les levures	70,3	— 0,8

Ainsi donc, la levure joue le même rôle, un peu plus faible, que les globules dans la diminution des protéides.

ON PEUT REMPLACER LE PLASMA PAR LE SÉRUM.

Si, au lieu du plasma, on étudie dans les mêmes conditions le sérum, on observe exactement le même phénomène.

EXPÉRIENCE N° 27. — On prend 10 cent. cubes de sérum de lapin qu'on additionne de fluorure de sodium à raison de 10 p. 1.000. On

remet ce sérum fluoré sur le culot de centrifugation de 10 cent. cubes de sang de lapin frais, dont le plasma contient 72 gr. 5 de protéides par litre.

	PROTEIDES en grammes par litre	VARIATIONS du taux des protéides p. 100 par rapport au témoin
Sérum fluoré à 10 p. 1.000	77,40	—
Même sérum après le contact avec les globules rouges.	66,30	— 14,4

Le plasma ne possède donc aucune propriété spéciale, puisque le sérum réagit de la même façon.

9° La diminution du taux des protéides n'est pas due à une précipitation de ceux-ci par les anticoagulants.

Examinons maintenant s'il se produit une précipitation dans le sang total. On pourrait penser que par leur charge électrique, les globules rouges pourraient provoquer une précipitation des protéides amenés à un état de déséquilibre par addition de substances étrangères.

On sait que les sels provoquent électivement la précipitation d'une des fractions protéidiques du sérum ou du plasma, le plus souvent une partie ou la totalité des fractions globuliniques. Le sulfate d'ammonium à demi-saturation, le sulfate de sodium à 22.2 p. 100 et le sulfate de magnésium à saturation précipitent la totalité des globulines ; le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, le sulfate de sodium à 14 p. 100 précipitent des fractions différentes, mais cependant dénommées toutes deux euglobulines, etc...

Si réellement la diminution des protéides que nous observons provenait d'une précipitation de ceux-ci par les anticoagulants ajoutés, le rapport globulines/albumines se trouverait affecté dans le plasma du sang traité et ne correspondrait plus au chiffre donné par le plasma témoin. Remarquons, en outre, que la quantité de substances mises en jeu dans nos expériences est de beaucoup inférieure à celle qui provoque un début de précipitation.

Nous séparons les globulines par le sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation. Nous les purifions par redissolution dans l'eau distillée et reprécipitation par le sulfate d'ammonium neutre à demi-saturation ; nous les redissolvons de nouveau dans l'eau distillée et les reprécipitons par l'acide trichloracétique en concentration finale de 10 p. 100. Nous précipitons les albumines des eaux-mères par l'acide trichloracétique en concentration finale de 10 p. 100. Nous les centrifugeons, les dissolvons dans l'eau distillée additionnée d'une quantité de soude juste suffisante. Ensuite, les deux fractions ainsi obtenues sont lavées par centrifugation, à quatre reprises, dans l'acide trichloracétique à 10 p. 100, pour éliminer toute trace de sulfate d'ammonium. On pratique ensuite les dosages d'azote.

	PROTEIDES totaux par litre	GLOBULINES par litre	ALBUMINE par litre	RAPPORT G/A
EXPÉRIENCE N° 28.	—	—	—	—
Plasma témoin	63,62	17,61	46,20	0,381
Plasma du sang oxalaté à 1 p. 100.	44,39	12,38	32,11	0,382
EXPÉRIENCE N° 29.				
Plasma témoin	58,99	19,62	39,37	0,498
Plasma du sang à 0,5 p. 100 de CO^3Na^2 (1)	50,30	13,26	27,04	0,496

On voit donc que la diminution affecte proportionnellement les deux fractions protéidiques du plasma. Il est difficile de concevoir qu'il s'agisse ici d'une précipitation des protéides. Tout se passe comme si le plasma était dilué. Etant donné que le phénomène ne s'observe que dans le sang total, si notre hypothèse est exacte, l'eau qui dilue le plasma ne peut provenir que des globules rouges. Nous n'avons pas utilisé les autres anticoagulants, tels que l'héparine, car on sait que la présence de cette dernière suffit à inverser le rapport G/A par déplacement du point isoélectrique des protéides, comme les travaux de Fisher l'ont démontré.

(1) Nous avons utilisé, en ce cas, CO^3Na^2 qui se montre anticoagulant à hautes doses.

10° Les autres constituants du plasma accusent aussi une diminution par addition d'anticoagulants au sang.

Nous nous sommes adressé aux corps qui sont en quantité assez importante dans le sang, tels que le glucose, pour lesquels on possède des méthodes de dosage précises et commodes. Il est à remarquer que ces corps se trouvent à un taux très faible dans le sang par rapport aux protéides et la différence observable est presque à la limite de l'erreur d'expérience, surtout quand l'anticoagulant est ajouté à doses faibles. Aussi nous nous sommes adressé à l'anticoagulant qui donne les différences les plus marquées, le fluorure de sodium à la concentration de 1 p. 100. Le glucose a été dosé par la méthode de G. Bertrand, adaptée pour les microdosages par de Saint-Rat et Ronfaut [164].

PLASMA FLUORÉ A 1 P. 100 en grammes par litre			VARIATIONS en p. 100
Après séparation des globules rouges	Avant séparation des globules rouges		
EXPÉRIENCE N° 30.			
Protéides	68,90	58,90	— 14,5
Glucose	1,73	1,45	— 16,1
Protéides	68,70	57,20	— 16,7
Glucose.	1,06	0,87	— 17,9
Protéides	72,70	60,50	— 16,8
Glucose.	2,77	2,33	— 15,8

Les résultats de Fontès et Thivolle [52] qui ne trouvent pas de différence dans le taux de glucides plasmatiques dosés, d'une part sur le plasma du sang fluoré et, d'autre part, sur le plasma du sang non additionné d'anticoagulants, ne peuvent tenir qu'à la technique de dosage employée par ces auteurs pour reconnaître les faibles variations en glucides dues à l'utilisation de fluorure à 2 p. 1.000.

Pour nous mettre à l'abri d'une erreur de dosage due à la

présence du fluorure, nous avons fluoré le plasma témoin après séparation des globules rouges au même taux que le sang total.

On voit que, malgré les inconvénients des dosages sur de faibles quantités, la diminution du glucose est sensiblement du même ordre de grandeur que celle des protéides.

Man et Guildea [130] ont fait une constatation analogue pour les acides gras : le taux de ces derniers est plus grand dans le sérum et le plasma hépariné que dans le plasma oxalaté. Schmidt [167], en confirmant les constatations des auteurs précédents, trouve que le taux des phospholipides est de 10 à 12 p. 100 moindre dans le plasma du sang oxalaté à 2,4 p. 1.000 que dans le plasma du sang hépariné. Man et Guildea n'acceptent pas l'interprétation de ce phénomène donnée par Mac Lean et Mac Lean [125] qui pensent qu'il s'agit ici d'une précipitation des phospholipides par l'oxalate et, d'après eux, ces variations proviennent de la modification du volume des globules rouges par l'oxalate.

Sperry et Schoenheimer [179], à la suite du travail de Schmidt, dosent le cholestérol sur le plasma hépariné, oxalaté et sur le sérum d'un même sujet ; ils constatent que le plasma oxalaté est plus pauvre en cholestérol total que le plasma hépariné ou le sérum et que le cholestérol, libre et combiné, a diminué dans les mêmes proportions. Ils adoptent l'interprétation de Schmidt et admettent que cette différence est due à l'altération du volume globulaire par l'oxalate et ils reconnaissent que le plasma oxalaté ne peut pas être utilisé pour le dosage du cholestérol.

Aux mêmes résultats sont arrivés tout récemment Gardner, Gainsborough et Murray [57] en dosant le cholestérol dans le sang oxalaté et hépariné. L'addition d'oxalate à 2. p. 1.000 provoque une diminution du taux de cholestérol d'environ 4 p. 100, par rapport au sang hépariné, et ces auteurs estiment que le dosage par ce dernier moyen est correct ; cependant nous savons que l'héparine, comme tous les autres anticoagulants, provoque une diminution du taux de protéides variant de 2 à 4 p. 100 quand on l'utilise, comme ils l'ont fait, à des doses de 150 à 200 milligrammes par litre. Il s'agit

réellement d'une dilution du plasma. D'ailleurs l'expérience suivante en fournit la démonstration.

EXPÉRIENCE n° 31. — 5 cent. cubes de plasma témoin et 5 cent. cubes de plasma de sang oxalaté sont desséchés jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique. On pratique sur une fraction du plasma témoin et sur la même quantité du plasma oxalaté, les dosages d'oxalate par la méthode classique. L'excès d'oxalate existant dans le plasma oxalaté ainsi déterminé, on soustrait du poids du plasma oxalaté le poids d'oxalate contenu dans 5 cent. cubes.

Finalement, 5 cent. cubes de plasma témoin pèsent 0 gr. 3668 et le plasma oxalaté, diminué du poids de l'oxalate dont le taux est de 106 centigrammes par 100 centimètres cubes de plasma, égale 0,3276. Le plasma oxalaté contient donc moins de matière sèche que le plasma témoin, soit $0 \text{ gr. } 3668 - 0 \text{ gr. } 3276 = 0 \text{ gr. } 0392$. La perte de matière sèche est égale à 10,7 p. 100. Le dosage des protéïdes de ces deux plasmas a donné les résultats suivants : le plasma témoin contient, par litre, 62 gr. 10 et le plasma oxalaté 55 gr. 2. La diminution est égale à 11,1 p. 100, chiffre sensiblement identique à celui qu'on trouve comme perte en matière sèche.

Le plasma du sang traité par l'oxalate contient donc réellement moins de substances dissoutes que le plasma témoin.

11° Ce sont les modifications de la concentration moléculaire du plasma qui régissent les échanges d'eau entre plasma et globules.

Les échanges d'eau entre deux solutions séparées par une membrane semi-perméable sont sous la dépendance : 1° de la concentration de deux solutions, 2° de la perméabilité de la membrane aux ions dont la répartition est régie par la loi de Donnan. Dans le sang, il existe un équilibre osmotique entre le plasma et les globules. L'addition d'un anticoagulant en poudre ou en solution concentrée dans le sang en augmentant la concentration moléculaire du plasma, rompt cet équilibre. Pour revenir à un nouvel équilibre, une certaine quantité d'eau doit passer des globules dans le plasma en même temps que se produit un certain échange ionique entre les deux phases.

Par suite, non seulement les anticoagulants mais toutes les substances qui se dissolvent dans le plasma produiront le

même effet, électrolytes ou substances non ionisées. Voici deux exemples que nous donnons ici :

	PROTÉIDES par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
EXPÉRIENCE N° 32.		
Plasma témoin	63,5	
Plasma du sang additionné de NaCl à 3 p. 1.000.	59,6	— 6,4

Nous savons que l'héparine en solution n'apporte dans le plasma qu'un changement négligeable. Aussi comme témoin nous avons utilisé le plasma hépariné parce que la dissolution de NaCl et celle du glucose exigent trop de temps pour qu'on puisse la faire dans le plasma simple.

	PROTÉIDES par litre de plasma	VARIATIONS en p. 100
EXPÉRIENCE N° 33.		
Plasma témoin	67,0	
Plasma hépariné avec une solution d'héparine à raison de 150 milligrammes par litre . . .	67,0	0
Plasma héparine + NaCl en concentration finale de N/5	55,2	— 17,6
Plasma héparine + glucose en dilution finale de N/5	55,0	— 17,9

Au cours d'expériences ultérieures, nous aurons l'occasion d'apporter de nombreux exemples du même genre pour d'autres substances et nous estimons qu'il est inutile d'y insister davantage ici.

Il est évident qu'en diminuant la concentration moléculaire du plasma, nous produisons le phénomène inverse, c'est-à-dire le passage de l'eau du plasma vers les globules. Cette diminution de la concentration moléculaire peut être obtenue de deux manières différentes, soit en diluant directement le plasma avec de l'eau, soit en le dialysant dans un sac de collodion.

EXPÉRIENCE N° 34. — On prend 20 cent. cubes de sang hépariné à 150 milligrammes/litre et on le partage en deux tubes. Dans l'un, on ajoute 2 cent. cubes d'une solution de chlorure de sodium à 8,5 p. 1.000, solution que l'on peut considérer comme approximativement isotonique. Dans l'autre, on ajoute, goutte à goutte, 2 cent.

cubes d'une solution de NaCl à 3. p. 1.000, solution largement hypotonique. Nous avons alors :

	PROTÉIDES en grammes par litre	AUGMENTATION
1° Plasma du sang additionné d'une solution de NaCl à 8,5 p. 1.000	48,2	—
2° Plasma du sang additionné d'une solution de NaCl à 3 p. 1.000.	50,2	+ 4,15

Le plasma du sang rendu hypotonique est donc plus riche en protéides que le sang dont la concentration n'a pas ou n'a que peu varié.

Dans les expériences où l'on rend le plasma hypotonique par dialyse, les résultats sont encore plus nets.

EXPÉRIENCE N° 35. — On prélève le sang d'un lapin. Une partie de ce sang est centrifugée immédiatement pour procéder au dosage des protéides et aux mesures cryoscopiques. Le reste du sang est hépariné à raison de 150 milligrammes/litre. Une partie du plasma du sang hépariné, prélevé par centrifugation, est dialysé dans un sac de collodion contre l'eau distillée pendant trente-cinq minutes, dans un dialyseur de Machebœuf et Sandor. On exerce sur le plasma une pression de 5 cm. de Hg. pour éviter la dilution de celui-ci par endosmose. On a ainsi deux sortes de plasma, le plasma du sang hépariné et dialysé et le plasma du même sang hépariné et non dialysé. On les remet respectivement sur les globules rouges qui en provenaient. L'abaissement du point de congélation et le pH de toutes ces fractions ont été mesurés. Le pH a été déterminé par la méthode électrométrique à l'aide de l'électrode à hydrogène de Sannier.

	Δ en degrés	pH à 20°	PROTEIDES en grammes par litre	VARIATIONS en p. 100
Plasma du sang hépariné. .	— 0,59	7,96	64,20	—
Plasma du sang hépariné et dialysé.	— 0,39	7,93	64,00	— 0,3
Plasma du sang hépariné et remis sur ses globules rouges.	— 0,60	7,95	64,30	— 0,46
Plasma du sang hépariné et dialysé et remis sur ses globules rouges	— 0,51	7,93	73,80	+ 15,0

On voit donc que le plasma rendu hypotonique s'enrichit en protéides au contact des globules rouges, comme on pouvait déjà le prévoir. L'eau du plasma passe dans les globules jusqu'à ce que le nouvel équilibre soit atteint.

12° Modifications des volumes respectifs du plasma et des globules.

La mesure du volume globulaire paraît, au premier abord, très simple. Plusieurs méthodes ont été proposées pour cette évaluation. La plus courante et la plus anciennement connue est celle de l'hématocrite. Les autres sont : la réfractométrie, la conductibilité électrique du sang, la viscosité, la colorimétrie, le dosage sur le sang additionné de sels. Aucune de ces méthodes n'est exempte d'erreur. La réfractométrie, la dilution du sang par des solutions salines, la conductibilité [172], la viscosité se montrent, d'après Ponder et Saslow [150] qui les ont pratiquées, nettement insuffisantes.

Jenkins [98] additionne le sang rendu incoagulable d'une solution d'hémoglobine en quantité déterminée. Il centrifuge et mesure le degré de dilution de l'hémoglobine dans le plasma par rapport à une solution standard. Les résultats ainsi obtenus présentent, par rapport à la méthode de l'hématocrite, une différence en moins qui est de 7 à 26 p. 100 pour le volume globulaire. Toutes ces méthodes exigent la dilution du sang par des solutions salines ; il est alors évident qu'à moins d'utiliser une solution rigoureusement isotonique, le volume globulaire se trouve modifié avant même de commencer la mesure. Or, couramment on évalue de 8 à 9 grammes pour 1.000 la teneur en NaCl d'une solution isotonique pour les globules rouges : Hampson et Maizels [77] l'évaluent à 7 gr. 2 p. 1.000, alors que Ponder et Saslow [150] l'estiment à 11 gr. 2 par litre.

Christensen et Warburg [27] ont étudié la composition des solutions salines dans lesquelles le volume globulaire ne change pas. Ils ont démontré que les solutions de sels d'oxalate ou de citrate au même Δ que le sérum ne sont pas réellement équilibrées et que les globules rouges mis en suspension dans ces solutions diminuent de volume. Cette diminution dans des solutions considérées comme isotoniques atteint 10 p. 100 pour le citrate à 2 p. 100 et 4 p. 100 pour l'oxalate à 1,3 p. 100. Ils admettent, d'après la théorie

de Hamburger, que le changement de pH du sang par départ de l'acide carbonique est la principale source de ces modifications. Ils arrivent à conclure qu'il n'est ni suffisant, ni nécessaire que la solution soit du même Δ que le sérum pour que le volume globulaire reste constant. Il est indispensable d'introduire des tampons pour éviter le changement du pH du sang. Étant donné que nous sommes si peu renseignés sur la véritable valeur d'une solution isotonique, toutes les méthodes de mesure du volume globulaire qui commandent la dilution du sang sont à condamner.

La méthode colorimétrique que Ponder et Saslow [150] estiment précise, a cependant donné entre leurs mains des résultats étranges, à savoir que le volume des globules rouges ne diminue pas dans une solution hypertonique, alors que toutes les observations faites avec les autres méthodes prouvent le contraire.

La méthode à l'hématocrite, plus simple, donne les résultats les plus constants. Les mesures ne sont que relatives car le volume trouvé dépend du nombre de tours et du temps de centrifugation, de la viscosité du milieu, etc... Millar [134] a étudié cette méthode et en fait une critique serrée, de même que Ponder et Saslow [150]. En effet, cette méthode est loin d'être parfaite, comme on le voit par les valeurs dues à différents auteurs pour le volume moyen des globules rouges de l'homme en mp^3 : Capps : 100 [25] ; Millar : 70 [134] ; Limbeck : 68 [117]. Les différences dépassent 30 p. 100.

En conclusion, nous ne possédons pas de méthode capable de déterminer avec précision le volume globulaire et le volume plasmatique. Comme il fallait néanmoins en choisir une, nous avons pris celle à l'hématocrite comme la moins erronée.

Limbeck observe que le volume globulaire subit des modifications en rapport avec la tonalité du milieu environnant : les solutions hypertoniques amènent une diminution du volume globulaire, tandis que le contraire se produit dans les solutions hypotoniques.

Depuis, ce fait a été signalé maintes et maintes fois. Wipple et ses collaborateurs, en 1920, indiquent que le volume globu-

laire diminue de plus en plus quand on ajoute au sang des doses de plus en plus fortes d'oxalate de soude. Eisenmen [44], Man et Gildea [130], Schmidt [167], Wilander [197], etc., ont remarqué que le volume globulaire est plus grand dans le sang hépariné que dans le sang oxalaté. Rossdale indique aussi que l'oxalate réduit plus fortement le volume globulaire que le citrate quand ces corps sont utilisés aux mêmes concentrations. Ponder, soit seul, soit avec Saslow ou Robinson [147-151], a étudié aussi les variations du volume globulaire dans les milieux de tonicité différente.

Nous avons voulu vérifier ces variations du volume globulaire en fonction de la tonicité du milieu. Toutes nos mesures ont été faites comparativement avec le sang hépariné comme témoin, pour la raison que nous avons exposée plus haut.

La centrifugation du tube de l'hématocrite a été faite à 9.000-10.000 tours-minute pendant quarante-cinq minutes. La colonne des globules rouges, quand la concentration du sang n'est pas très élevée, devient transparente après ce temps de centrifugation. Phénomène désigné sous le nom de critérium de Köppe [104].

Nous allons exposer une de nos expériences qui ont toutes donné des résultats sensiblement identiques.

EXPÉRIENCE N° 36. — Le sang d'un lapin, prélevé par ponction carotidienne et hépariné à raison de 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 0,75 p. 100, est séparé en quatre parties. On additionne la première partie d'oxalate de potassium en poudre à raison de 10 p. 1.000, la deuxième de fluorure et la troisième de citrate de sodium au même titre que l'oxalate. Le quatrième échantillon nous sert de témoin.

On pratique au bout de quinze minutes, sur ces 4 échantillons bien mélangés, les mesures du volume globulaire et le dosage d'azote.

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VOLUME globulaire en p. 100
Plasma hépariné à 0,15 p. 100	62,40	38
Plasma du sang oxalaté à 10 p. 1.000.	55,20	30
Plasma du sang fluoré à 10 p. 1.000.	51,50	25
Plasma du sang citraté à 10 p. 1.000	55,90	32,5

Il est facile, en calculant les protéines contenues dans

100 cent. cubes de sang, de montrer que la quantité totale des protéides du plasma reste la même dans tous ces échantillons. Dans le plasma hépariné, nous avons 0,0621 de protéides par centimètre cube ; et comme le volume des globules = 38 p. 100, le plasma équivaut à 62 p. 100 du volume du sang, par conséquent dans 1.000 cent. cubes de sang, nous aurons $0,0621 \times 62 \times 10 = 38$ gr. 5 de protéides plasmatiques. Les calculs faits avec le plasma oxalaté donnent $0,0552 \times 70 \times 10 = 38,6$; le plasma fluoré 38 gr. 6, le plasma citraté 38 gr. 2. Contrairement aux expériences de Scott et Lehman, nous ne trouvons pas ici de disparition des protéides totaux dans les milieux hypertoniques.

Les variations observées qui ne dépassent pas ± 2 p. 100 dans nos divers échantillons résultent de l'erreur inséparable de la méthode à l'hématocrite.

On voit que pour avoir le taux des protéides du sang, il faut tenir compte du volume des globules.

Le dosage des protéides après addition au sang d'anticoagulants en solution reste aussi exact quand on tient compte de la dilution introduite.

EXPÉRIENCE N° 37. — On arrête la coagulation d'un sang de lapin en y ajoutant une solution d'héparine à 0,75 p. 100 à raison de 0 gr. 150 p. 1.000. Ce sang est divisé en deux parties. L'une est additionnée au 1/10 d'une solution d'oxalate de potassium saturée, l'autre sert de témoin. Le plasma des deux parties est séparé par centrifugation après quinze minutes de repos. Pour le plasma hépariné, nous avons obtenu les résultats suivants :

Volume plasmatique : 62 p. 100. Volume globulaire : 38.

Taux de protéides dans le plasma : 6,21 p. 100.

1 cent. cube de plasma contient donc : 0,0621 de protéides.

Dans 1.000 cent. cubes de sang, nous aurons : $0,0621 \times 62 \times 10 = 38,5$ de protéides.

Pour le plasma oxalaté, on a également :

Volume plasmatique : 75 p. 100. Volume globulaire : 25.

Taux de protéides : 4,60 p. 100 de plasma.

1 cent. cube de plasma contient donc : 0,046 de protéides.

Dans 100 cent. cubes de sang, nous aurons : $0,046 \times 82,5 = 38$ gr., en faisant la correction que nécessite la modification du volume initial par addition de 10 cent. cubes de la solution d'oxalate pour 10 cent. cubes de sang. Le volume réel sera donc 75 p. 100 de 110 = 82 cent. cubes 5.

Les nombreux dosages que nous avons pratiqués de cette façon nous ont toujours donné des résultats dont l'erreur ne dépassait pas plus ou moins 2 p. 100.

13° Perméabilité sélective des globules rouges aux différents ions.

L'échange d'eau entre globules et plasma n'est pas le seul phénomène qu'on observe quand on change la tonicité du plasma. Il passe aussi certains ions. La question de la perméabilité globulaire est très discutée. Hamburger et Bubanovic [74], Ashby [4], Ponder et Robinson [149], Davson [32-36] prétendent que la paroi des globules rouges est perméable aux cations. Mais la plupart des autres auteurs : Mond [137], Kerr [101], Henderson [83], Wakeman, Eisenman et Peters [191], Van Slyke, Wu et Mac Lean [189], Gürber [67], Hamburger [73-75], Falta et Richter-Quittner [46], Maizels [127], Halverson, Möhler et Bergeim [70] estiment que la paroi globulaire est pratiquement imperméable aux cations quand on se place dans des conditions assez voisines de l'état physiologique normal, c'est-à-dire quand les globules rouges ne sont pas altérés (pH, trop grande concentration saline, séparation des protéides du plasma, etc...).

La perméabilité aux anions paraît moins discutée. Hamburger [73], Maizels [128-129], Van Slyke et Cullen [188], Fredericia [54], Henderson [83] et beaucoup d'autres auteurs indiquent que les globules rouges sont perméables aux anions si le pH du sang n'a pas subi de grandes variations vers l'alcalinisation. La perméabilité aux anions croît rapidement avec l'acidification du milieu. Cependant Levy, Mignon et Haffner [115] n'arrivent pas, par leur méthode, à démontrer la perméabilité de la paroi globulaire au chlore.

Dans nos expériences, la dilution du plasma par l'eau après addition de sel au sang globulaire, indique une nouvelle répartition ionique, qui est régie par le passage de l'eau et par la perméabilité sélective de la membrane globulaire. Si un même échantillon de sang est additionné de sels différents,

à molarité égale, la diminution respective des protéides trouvées nous renseignera sur le passage des différents ions à travers la paroi globulaire.

EXPÉRIENCE N° 38, faite sur le sang de mouton hépariné à 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 5 p. 100. Le sang est réparti en douze tubes à centrifugation par portions de 10 cent. cubes mesurées avec précision. On ajoute dans chaque tube exactement 2 cent. cubes d'une solution de NaCl ou de glucose à molarité différente. On utilise les solutions de 3 N, 2 N, N, N/2, N/4 et N/10. On agite bien et on laisse les mélanges à la température du laboratoire pendant trente minutes avant de les centrifuger. On pratique alors sur le plasma le dosage d'azote protéidique et on détermine le Δ de tous les échantillons de plasma. Voici les résultats.

	Δ du plasma en degrés	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes
Pour le NaCl :		
Sang + la solution de NaCl à 3 N	— 2,73	49,00
Sang + la solution de NaCl à 2 N.	— 1,99	49,44
Sang + la solution de NaCl à 1 N.	— 1,24	51,19
Sang + la solution de NaCl à N/2	— 0,82	53,38
Sang + la solution de NaCl à N/4	— 0,69	54,69
Sang + la solution de NaCl à N/10	— 0,58	56,88
Pour le glucose :		
Sang + la solution de glucose à 3 N	— 1,84	49,44
Sang + la solution de glucose à 2 N	— 1,37	50,75
Sang + la solution de glucose à 1 N	— 0,93	52,50
Sang + la solution de glucose à N/2	— 0,68	55,12
Sang + la solution de glucose à N/4	— 0,61	56,00
Sang + la solution de glucose à N/10	— 0,55	57,31

En représentant ces résultats graphiquement, on constate un phénomène curieux : Les chiffres trouvés expérimentalement pour le glucose ou pour le chlorure de sodium se placent sur une même courbe. La diminution des protéides est donc identique pour ces deux corps quand le Δ du plasma est le même. Cela veut dire que les molécules de NaCl ou les molécules de glucose se comportent de la même façon vis-à-vis de la paroi globulaire (Voir graphique n° 4). La dilution de protéides du plasma indique que l'eau globulaire passe vers le plasma ; par conséquent la paroi globulaire est peu ou pas perméable pour NaCl et pour le glucose. Nos expé-

riences avec d'autres sels tels que le chlorure de potassium, l'iodure de potassium, le bromure de potassium et le nitrate de sodium donnent des résultats analogues. Il en résulte que dans les conditions de nos expériences nous n'observerons pas de perméabilité globulaire appréciable ni pour les électrolytes, ni pour les molécules non ionisables des corps précipités. Cependant ces constatations se trouvent en contradiction avec ce que nous savons sur le métabolisme des globules rouges.

Cherbuliez [26] a étudié la concentration moléculaire des globules rouges et du plasma en variant la molarité de ce dernier. Il trouve que le Δ des globules reste toujours un peu inférieur à celui du plasma, phénomène déjà connu par les expériences de Moor et Roaf [135] et de Collip [28] et critiqué par d'autres auteurs. Cependant la concentration moléculaire des globules suit, tout en restant légèrement au-dessous, celle du plasma.

Pour Régnier [58], ces expériences démontreraient que les sels peuvent pénétrer dans les globules rouges ou s'en échapper pour maintenir la concentration moléculaire des globules. Que la paroi globulaire soit perméable ou non aux différents sels, nous ne discutons pas cette hypothèse, mais les expériences de Cherbuliez s'expliquent tout aussi bien par passage d'eau des globules vers le plasma quand on augmente la concentration moléculaire de celui-ci et inversement par passage de l'eau plasmatique dans les globules quand le Δ plasmatique est plus faible que celui des globules.

LA PAROI GLOBULAIRE PERMÉABLE A L'EAU, COMME NOUS L'AVONS VU, EST AUSSI PERMÉABLE A L'URÉE. — On sait que les globules rouges s'hémostolysent dans des solutions isotoniques d'urée. Nous avons essayé d'ajouter au sang des solutions fortement hypertoniques, 2N, d'urée sans empêcher l'hémostolyse de se produire. La solution d'urée se comporte vis-à-vis des globules tout à fait comme l'eau distillée. Pour étudier de plus près ce phénomène, nous avons adopté la méthode suivante :

EXPÉRIENCE N° 39. — On prépare une solution de NaCl N/5. Cette solution est divisée en trois parties : l'une sert de témoin, la deuxième est additionnée d'urée en poudre, de façon à avoir une solution d'urée égale à N/5, et la troisième est traitée pareillement avec du glucose, corps non ionisable comme l'urée. D'autre part, on prend du sang de lapin, hépariné à 150 milligrammes par litre avec une solution d'héparine à 5 p. 1.000. 2 cent. cubes des trois solutions précédentes sont ajoutés respectivement à 10 cent. cubes de sang. On agite et on centrifuge après une demi-heure. Puis on pratique le dosage de l'azote sur le plasma précipité par l'acide trichloracétique et lavé à cinq reprises pour éliminer l'urée. On a pris soin de mesurer les volumes globulaires de chaque mélange par l'hématocrite. Voici les résultats :

	NaCl N/5	NaCl N/5 + urée N/5	NaCl N/5 + glucose N/5
Volume globulaire p. 100.	25	25	23
Protéides par litre de plasma, en grammes.	48,45	48,02	46,91
Protéides par litres de sang, en grammes.	36,12	36,05	36,12

Cette expérience nous indique que l'urée ne provoque ni variation du volume globulaire, ni diminution du taux de protéides plasmatiques, qu'elle traverse la paroi globulaire très facilement et que la concentration moléculaire restant la même à l'extérieur et à l'intérieur du globule, tout appel d'eau du globule vers le plasma, donc toute dilution de ce dernier, se trouvent écartés.

L'urée n'intervient donc pas dans l'équilibre osmotique des globules rouges. Grâce à sa grande diffusibilité, elle traverse facilement la paroi cellulaire. Quand on suspend les globules rouges dans une solution même hypertonique d'urée sans autres sels, l'urée se répartit uniformément dans les deux phases et le contenu des globules, renfermant les divers sels peu ou pas diffusibles, devient ainsi hypertonique par rapport au milieu extérieur. L'eau pénètre dans les globules et provoque l'hémolyse. Tout se passe sensiblement comme dans l'eau pure.

RÔLE DE LA CONCENTRATION EN IONS H^+ SUR LA PERMÉABILITÉ GLOBULAIRE. — Comme, dans les expériences ci-dessus, nous avons utilisé le sang conservé à l'air sans aucune précaution spéciale, et que le départ de l'acide carbonique fait monter

le pH du sang de 7,35 à 7,5 — 8,0, il ne manquait pas d'intérêt de rechercher l'influence des variations du pH sur la perméabilité globulaire.

EXPÉRIENCE N° 40. — On prépare une solution d'acide chlorhydrique dont on ajuste le Δ à $-3^{\circ}80$; les mesures ont été faites sur la solution diluée à 1 pour 5, dont le Δ est égal à $-0^{\circ}76$. Une solution de NaCl est ajustée exactement au même Δ . Ces deux solutions sont mélangées en proportions différentes.

1° 9 cent. cubes 1/2 de la solution de NaCl + 1/2 cent. cube de solution acide ;

2° 9 cent. cubes de NaCl + 1 cent. cube d'acide ;

3° 8 cent. cubes de NaCl + 2 cent. cubes d'acide, et ainsi de suite 3, 4 et 5 cent. cubes d'acide pour 7, 6, 5 de la solution de NaCl.

On prélève 150 cent. cubes de sang de lapin qu'on rend incoagulable avec une solution d'héparine à 5 p. 100 à raison de 150 milligrammes d'héparine par litre. Le sang est réparti par 15 cent. cubes dans 7 tubes à centrifugation. Dans le premier tube on ajoute 2 cent. cubes de solution de NaCl pure, dans les suivants 2 cent. cubes de chaque mélange préparé comme nous l'avons dit. On mélange bien le sang avec les solutions et on abandonne les tubes à la température du laboratoire pendant une heure. Le volume globulaire est déterminé à l'hématocrite. Ensuite, le plasma obtenu par centrifugation est analysé à trois points de vue : 1° on dose l'azote protéidique ; 2° on détermine le Δ du mélange ; 3° on mesure le pH de ces plasmas à l'aide d'une électrode à l'hydrogène de Sannié. Voici les résultats que nous avons obtenus.

45 CENT. CUBES de sang additionnés de 2 cent. cubes de	pH du plasma	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	PROTÉIDES par litre de sang en grammes	VOLUME global	Δ en degrés
NaCl	7,95	56,00	42,56	24,0	$-1,015$
NaCl 49 parties . . . HCl 1 partie . . .	7,77	56,44	42,61	24,5	$-1,010$
NaCl 9 parties . . . HCl 1 partie . . .	7,56	56,87	42,36	25,5	$-1,010$
NaCl 8 parties . . . HCl 2 parties . . .	7,35	58,19	42,47	27	$-0,965$
NaCl 7 parties . . . HCl 3 parties . . .	6,85	59,94	42,25	30,5	$-0,920$
NaCl 6 parties . . . HCl 4 parties . . .	6,03	66,06	42,93	35	$-0,895$

Dans le dernier mélange le plasma est légèrement teinté d'hémoglobine ; avec des solutions encore plus riches en acide, la destruction

des globules rouges est trop importante pour qu'on puisse en tirer une conclusion.

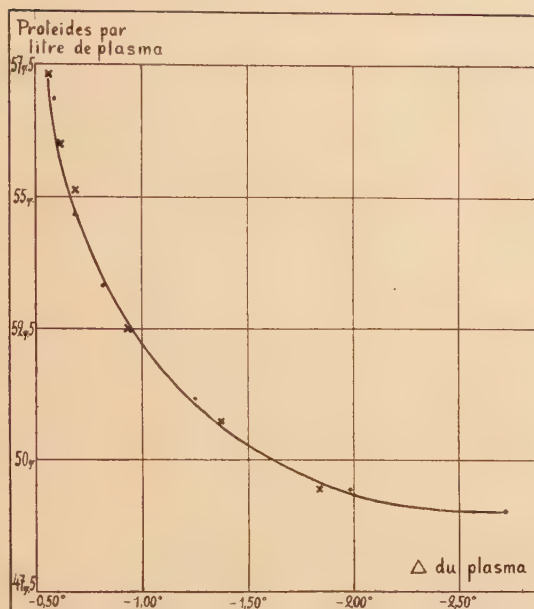
On voit qu'avec l'abaissement du pH, le plasma devient de plus en plus riche en protéides. L'augmentation de la concentration moléculaire du plasma varie dans ses effets à des pH différents. En milieu acide le passage de l'eau globulaire vers le plasma se produit avec moins d'intensité qu'en milieu alcalin, ce qui paraît être d'accord avec la théorie de Warburg et de Van Slyke sur la répartition de l'eau entre les globules et le plasma. On sait qu'en acidifiant le sang on augmente la concentration moléculaire des globules plus fortement que celle du plasma.

Le Δ du plasma s'abaisse légèrement avec l'introduction de quantités de plus en plus importantes d'acide, mais ces variations qui ne dépassent pas 0°120 et sont beaucoup trop faibles pour justifier les changements importants qui se produisent dans la concentration du plasma en protéides, comme on peut le voir par le graphique n° 1. On ne peut pas parler ici non plus de passage des protéides au travers de la paroi globulaire car la quantité de protéides totaux du plasma, rapportée au litre de sang, reste constante.

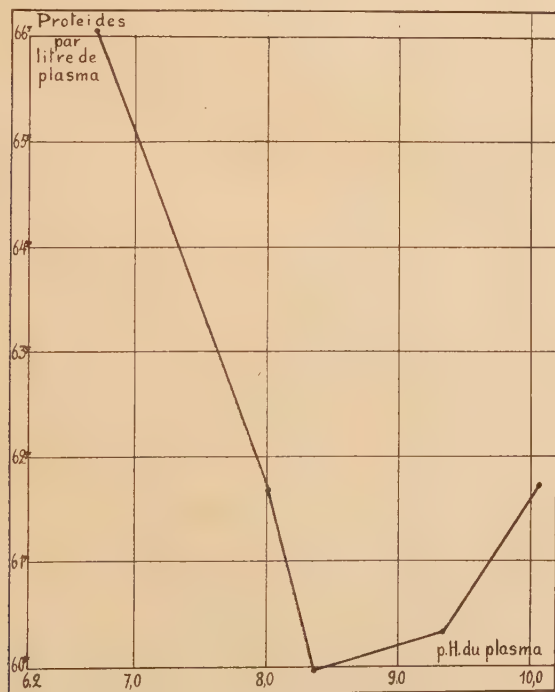
Existe-t-il un minimum de perméabilité pour les globules quand on augmente la concentration du milieu en ions $\text{OH}\cdot$? Pour cette expérience nous avons utilisé aussi l'acide chlorhydrique qui donne de meilleurs résultats que l'acide oxalique par exemple. Celui-ci produit une hémolyse rapide de globules à des pH moins élevés que l'acide chlorhydrique.

EXPÉRIENCE N° 41, faite sur le sang de mouton. — Trois solutions de HCl, de NaOH et de NaCl sont ajustées exactement au même Δ , comme précédemment. Cette fois, le point de congélation des solutions est égal à $-4^{\circ}00$. On prépare, comme dans l'expérience ci-dessus, des mélanges de NaCl avec l'acide ou la soude. Le sang de mouton est hépariné à 150 milligrammes par litre à l'aide d'une solution à 5 p. 100. Le plasma est séparé trente minutes plus tard, et on procède aux mêmes examens.

Le plasma se trouve le plus dilué à pH 8,37. A ce moment, la perméabilité pour NaCl passe par un minimum. A des pH plus faibles ou plus forts, le plasma se concentre, comme le graphique n° 2 l'indique. Comme dans l'expérience précé-



GRAPHIQUE n° 1. — En ordonnées le poids de protéïdes par litre de plasma, en abscisses les Δ du plasma. Les points indiquent les chiffres trouvés avec le chlorure de sodium, les croix, les valeurs avec le glucose.



GRAPHIQUE n° 2. — En ordonnées le poids des protéïdes contenus dans 1 litre de plasma; en abscisses, les pH du plasma.

20 CENT. CUBES de sang additionnés de 2 cent. cubes de	pH du plasma	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	PROTÉIDES par litre de sang en grammes	VOLUME global	Δ en degrés
NaCl 5 parties. . . } HCl 5 parties. . . }	6,38	66,06	46,90	29	— 0,77
NaCl }	8,02	61,69	46,88	24	— 0,91
NaCl 9 parties. . . } NaOH 4 partie . . . }	8,37	59,94	47,05	21,5	— 0,89
NaCl 7 parties. . . } NaOH 3 parties. . . }	9,38	60,37	47,09	22	— 0,86
NaCl 5 parties. . . } HCl 5 parties. . . }	10,05	61,69	46,88	24	— 0,80

dente, on ne peut parler davantage de passage des protéides, la quantité de ceux-ci restant, comme ci-dessus, constante dans le plasma pour un volume donné de sang. Les variations du Δ , ne dépassant pas 0°14, ne peuvent pas nous expliquer à elles seules des changements aussi importants dans la concentration du plasma. D'ailleurs, nous voyons qu'à pH 8,02 et à Δ — 0°91, le plasma est plus riche en protéides qu'à pH 9,38 et à Δ — 0°86.

Nous devons donc conclure de ces essais, que la perméabilité globulaire passe par un minimum qui se trouve aux environs de pH 8,3. Dans le milieu acide, la perméabilité croît rapidement, dans le milieu alcalin elle augmente plus faiblement. Quand on opère *in vitro*, les résultats varient fortement suivant le pH du milieu utilisé. Il n'y a rien d'étonnant à ce que, dans ces conditions, la question de la perméabilité globulaire ait donné lieu aux travaux les plus contradictoires.

Nous n'avons pas recherché la nature des ions qui traversent les globules à des pH différents. De nombreux auteurs ont vu que l'acidité du milieu est favorable au passage des anions. Mond [137], quoique ces travaux soient très discutés, a montré, par des dosages directs, que la paroi globulaire devient perméable aux cations en milieu alcalin, mais que les anions ne passent plus.

Ces expériences nous montrent qu'on peut, pour l'étude de la perméabilité globulaire, introduire dans le sang diverses

substances qui, par la dilution du plasma, vont nous indiquer leur degré de diffusibilité .

14° Conservation du sang additionné d'anticoagulants.

Dans les expériences citées jusqu'à présent, la séparation du plasma des globules après addition d'anticoagulants a été faite au bout de quinze minutes. Il est important d'étudier comment évolue le phénomène avec le temps. On est limité ici par la fragilité des globules rouges. Le plus souvent, le sang additionné d'anticoagulants accuse une hémolyse plus ou moins importante au bout de vingt-quatre, au plus tard quarante-huit heures, et le plasma devient inutilisable pour l'analyse. D'ailleurs, comme nous le verrons, le résultat se stabilise très rapidement.

EXPÉRIENCE N° 42. — On prend 40 cent. cubes de sang de lapin. On en centrifuge 10 cent. cubes dans un tube paraffiné pour avoir le plasma témoin. Les 30 cent. cubes restants sont additionnés d'oxalate de potasse à raison de 5 p. 1.000. Après avoir mélangé soigneusement, on divise le sang en trois parties. On centrifuge la première au bout de vingt-quatre heures. Pendant ce temps, le sang a été conservé à la glacière dans des tubes bouchés au liège. Voici les résultats :

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATION en p. 100
Plasma témoin	69,9	—
Plasma du sang oxalaté à 5 p. 1.000 et conservé pendant 15 minutes	63,3	— 9,4
Plasma du sang oxalaté à 5 p. 1.000 et conservé pendant 6 heures	63,4	— 9,3
Plasma du sang oxalaté à 5 p. 1.000 et conservé pendant 24 heures.	63,4	— 9,3

On constate donc que la diminution s'est produite au bout de quinze minutes et ne varie plus avec le temps.

EXPÉRIENCE N° 43. — Des résultats analogues se montrent avec le citrate de soude, comme l'indique l'expérience suivante. Cette fois, nous avons introduit l'anticoagulant en solution saturée à raison de 1 cent. cube pour 10 de sang de lapin. Une partie est centrifugée

à 10 tours/minute immédiatement après l'addition d'anticoagulant, pendant quatre minutes, de telle sorte que le plasma est séparé des globules en cinq minutes. L'autre partie est centrifugée au bout de trois heures. Le sang conservé pendant vingt-quatre heures est très hémolysé et abandonné. Voici les résultats :

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATION en p. 100
Plasma témoin	62,0	—
Plasma du sang citraté séparé au bout de 5 minutes.	45,1	
Plasma du sang citraté séparé au bout de 3 heures.	46,0	+ 2

La quantité de protéides aurait plutôt légèrement augmenté au bout de trois heures. Cela peut tenir à deux causes : soit simplement à une légère destruction des globules soit encore à une absorption par les globules d'une certaine quantité d'eau.

EXPÉRIENCE N° 44. — Dans 20 cent. cubes de sang de mouton, on verse 0,15 p. 1.000 d'une solution d'héparine à 5 p. 100 et 4 cent. cubes d'une solution normale de chlorure de sodium. Une partie du sang est centrifugée et analysée immédiatement, l'autre vingt-quatre heures plus tard. Les résultats ont été les suivants :

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes
Sang analysé immédiatement	50,2
Sang analysé après vingt-quatre heures	50,2

Comme pour le citrate et l'oxalate, la dilution du plasma est presque instantanée et ne varie pas avec le temps.

Cette rapidité d'équilibre n'a rien de surprenant. La paroi du globule rouge ne doit pas dépasser au plus quelques centièmes de μ d'épaisseur et il est évident que dans ces conditions les échanges sont très rapides entre les globules rouges et le milieu environnant.

15° Quantité d'eau osmotiquement libre dans les globules rouges.

La quantité d'eau libre dans les globules est importante à connaître, car elle régit la répartition des substances diffu-

sibles du sang entre les globules et le plasma : carbonates qui régularisent la respiration, ions H qui interviennent dans le maintien du pH sanguin, etc...

Gough [61] et Krevisky [105] évaluent en volume l'eau osmotiquement libre des globules à 30-35 p. 100. Hamburger [71-75], Warburg [194], Henderson [83], Parpart et Shull [142], Parpart et Ponder la trouvent égale à 47 à 60 p. 100. Enfin Eige [41], Eige et Roche [43], Somogyi [176-177], MacKay [121], Ponder [147-148] signalent des chiffres encore plus élevés et estiment l'eau libre à 60-70 p. 100 du volume de globules rouges. Si l'eau totale des globules rouges représente environ 69-70 p. 100 du volume globulaire, il en résulterait, d'après ces derniers travaux, que toute l'eau globulaire serait osmotiquement libre.

Tous les auteurs précédents déterminent l'eau libre par des méthodes indirectes. La méthode de beaucoup la plus employée est basée sur la loi de Mariotte en mesurant les modifications du volume globulaire dans des solutions de concentrations différentes. Les chiffres ainsi trouvés sont introduits dans la formule :

$$(V - x) \cdot P = (V' - x) \cdot P'$$

ou :

V est le volume globulaire initial à la pression osmotique P.

V' est le volume globulaire à la pression P'.

x est la fraction du volume globulaire qui ne prend pas part aux phénomènes osmotiques.

V est ordinairement mesuré directement à l'hématocrite.

P ne peut pas être mesuré directement et est remplacé par la mesure de l'abaissement du point de congélation du plasma.

Schiodt [165] a remarqué que le taux de l'eau libre trouvé par différents auteurs varie avec la concentration à laquelle ils ont travaillé. Pour des concentrations faibles, dont la tonicité est voisine de celle du sang, l'eau osmotiquement libre est égale à 60-65 p. 100 du volume du globule. Quand on augmente la concentration, la valeur trouvée baisse gra-

duellement jusqu'à 35 p. 100, ce qui permet d'expliquer les divergences de tous ces résultats.

Toujours d'après Schiodt, l'influence de la concentration ne retentit sur la valeur de l'eau libre que par l'inexactitude des lectures du volume globulaire. En effet, prenons le cas de concentrations voisines de la concentration normale du sang : quand on détermine le volume globulaire à l'hématocrite, après un temps de centrifugation suffisamment long pour obtenir un chiffre constant, la colonne des globules rouges paraît transparente. On explique ce fait, connu sous le nom de « Critérium de Köppe », par une bonne adhérence des globules entre eux. Mais si on le place dans des solutions concentrées, ce critérium ne s'observe plus. On admet alors qu'avec l'augmentation de la concentration, le globule rouge se déforme et qu'il se produit à sa surface des crénelures qui empêchent la bonne adhérence des globules entre eux. La mesure du volume globulaire deviendrait donc de plus en plus fautive à mesure qu'augmente la concentration du liquide qui entoure le globule.

Nous avons eu maintes fois l'occasion de nous apercevoir de l'inexactitude des lectures faites à l'hématocrite dans les milieux concentrés, mais ce n'est pas là la seule raison de la variation des valeurs de l'eau libre en fonction de la concentration.

Nous avons vu dans les chapitres précédents, que l'augmentation de la concentration moléculaire du liquide environnant le globule ne provoque pratiquement pas de modifications du taux des protéides plasmatiques quand le Δ dépasse — 2°. Cette constance du taux des protéides indique qu'ils sont toujours contenus dans le même volume, donc que le volume globulaire réel ne varie plus. En d'autres termes, en augmentant P, la valeur de V reste constante et la loi de Mariotte $P \cdot V = P' \cdot V' = Cte$ ne s'applique plus à partir de ces concentrations. On peut donc dire que tous les travaux faits par cette méthode dans les liquides de concentrations élevées doivent être tenus pour faux.

Puisque la détermination du volume globulaire est très inexacte dans les solutions concentrées, nous avons pensé à

exprimer dans la loi de Mariotte le volume globulaire en fonction du volume plasmatique que l'on peut mesurer indirectement.

Dans 100 cent. cubes de sang, le volume globulaire est :

$$100 - V_p \quad V_p = \text{volume plasmatique.}$$

Nous pouvons exprimer le volume plasmatique V_p par :

$$Q/C$$

où Q est le poids de protéides contenus dans 100 cent. cubes de sang, et C la concentration de protéides dans 1 cent. cube de plasma dans chaque échantillon.

La concentration C varie avec la tonicité du milieu qu'on peut déterminer très exactement par des dosages d'azote. Le poids de protéides Q par 100 cent. cubes de sang peut être établi une fois pour toutes, par dosage des protéides dans 1 cent. cube de plasma et par mesure du volume globulaire dans une solution isotonique, ce qui n'introduit que peu ou pas d'erreurs.

En introduisant ces valeurs dans la formule de Mariotte, on a :

$$\left[\left(100 - \frac{Q}{C} \right) - x \right] P = \left[\left(100 - \frac{Q'}{C'} \right) - x \right] P'.$$

Nos expériences ont été faites soit sur du sang de lapin, soit sur du sang de mouton préalablement hépariné. A 10 cent. cubes de sang nous avons ajouté 2 cent. cubes de solutions à différentes molarités de glucose ou de chlorure de sodium. Parmi ces divers mélanges, celui qui avait une tonicité aussi voisine que possible de celle du sang a servi à mesurer le volume globulaire à l'hématocrite.

Les valeurs trouvées pour des mélanges de tonicité voisine de celle du sang, nous ont donné les chiffres de 60-63 p. 100 du volume globulaire d'eau osmotiquement libre. Ces valeurs diminuaient au fur et à mesure que les concentrations croissaient pour tomber à 43 p. 100 quand la concentration du mélange avait un Δ de $-1^{\circ},5$. Cela tient probablement, comme l'a vu Cherbuliez [26], à ce que le Δ globulaire est

toujours plus faible que le Δ du milieu environnant et à ce que cette différence s'accuse de plus en plus pour de fortes concentrations. Il en résulte que l'erreur portant sur les valeurs trouvées pour P dans le plasma au cryoscope devient de plus en plus forte.

En résumé, dans les conditions physiologiques normales, l'eau globulaire est presque toute osmotiquement libre.

16° Discussion des travaux de Scott, de Bellis et Scott et de Lehman et Scott [89, 111, 171].

Ces auteurs prétendent que la paroi globulaire est perméable aux protéides du plasma. A l'appui de leur hypothèse, ils citent leurs expériences de dosages des protéides dans le plasma oxalaté et le sérum d'un même animal où ils trouvent que le sérum est relativement plus riche en protéides que le plasma oxalaté. Nous avons vu déjà dans le chapitre I que ces résultats s'expliquent tout autrement et que la diminution constatée dans le plasma n'est nullement provoquée par passage de protéides au cours de la coagulation. Elle se produit sous l'influence de la venue d'eau des globules rouges causée par l'augmentation de la concentration moléculaire du plasma due à l'addition d'anticoagulant. Le plasma du sang non traité est toujours plus riche en protéine que le sérum correspondant.

Dans d'autres séries d'expériences, ils diluent le sang dans des solutions hypotoniques ou soi-disant isotoniques de glucose et de différents sels. Ils observent alors que la quantité des protéides contenus dans le plasma augmente relativement avec les dilutions. Inversement, ils constatent que la dilution dans des solutions hypertoniques diminue relativement les protéides plasmatiques. On peut faire deux objections à ces expériences : 1° La méthode à l'hématocrite que les auteurs utilisent pour les déterminations du volume globulaire ne peut pas, comme nous l'avons vu déjà, donner des résultats tout à fait précis. Les erreurs sont surtout manifestes quand on travaille sur des solutions de densité et

de viscosité très différentes, parce que, ainsi que l'indique Ege [41], les globules se sédimentent beaucoup plus difficilement dans des solutions hypertoniques que dans des solutions iso- ou hypotoniques.

L'influence de la viscosité du sang sur la mesure du volume globulaire par l'hématocrite a été étudiée par Nygaard, Wilder et Berkson [140] qui ont trouvé qu'on peut exprimer la relation entre le volume globulaire et la viscosité du plasma à l'aide d'une fonction linéaire. Cela indique avec quelle prudence il faut interpréter les résultats des mesures à l'hématocrite pour déterminer le volume globulaire, surtout quand on travaille sur des solutions de composition différente. Les erreurs relatives sont faibles pour des solutions de compositions comparables, mais elles deviennent importantes dans le cas contraire. Scott et Lehman et Scott donnent des formules qui, d'après les volumes globulaire et plasmatique, permettent de calculer le volume initial du sang. L'application de ces formules entraîne de grosses différences pour une faible erreur dans la mesure du volume globulaire.

2° Les solutions soi-disant isotoniques sont en réalité hypotoniques car, même avec NaCl, il y a de grandes divergences de vue.

Considérant comme isotonique une solution de NaCl, les divers auteurs évaluent une telle solution de 7 à 11 grammes de NaCl par litre. En outre, une solution de même Δ que le plasma n'est pas isotonique pour les globules rouges, la qualité des sels intervient, certains ions passent du plasma vers les globules ou inversement. La répartition finale en est régie par loi de Donnan.

Christensen et Warburg [27] ont étudié la composition d'une solution isotonique avec les globules. Ils ont démontré que des solutions de sels tels qu'oxalate ou citrate au même Δ que le sérum ne sont pas isotoniques, car les globules rouges mis en suspension dans de telles solutions changent de volume. Pour la solution de citrate à 3 p. 1.000, la contraction globulaire atteint 10 p. 100 du volume initial, pour la solution d'oxalate à 1,3 p. 100 elle est de 4 p. 100.

Les auteurs indiquent que la principale cause d'erreur est le changement de pH du sang par départ de l'acide carbonique. Il n'est ni nécessaire, ni suffisant, d'après ces auteurs, que la solution soit de même Δ que le sérum, mais il faut qu'elle soit tamponnée pour éviter les modifications du pH du sang *in vitro*.

Aucun fait précis ne nous permet donc d'admettre le passage des protéides du plasma vers les globules ou inversement.

17° Application des données ci-dessus établies aux dosages des protéides du plasma.

L'addition au sang d'anticoagulants en poudre pour le dosage des protéides du plasma est de pratique courante dans les laboratoires, et l'on peut citer par dizaines les travaux où cette technique est utilisée. Tous ces dosages sont plus ou moins entachés d'erreur. Les résultats varient d'une espèce animale à l'autre, et dans une même espèce d'un animal à l'autre et pour le même animal, suivant l'état physiologique dans lequel il se trouve. Ils varient aussi suivant l'anticoagulant employé : l'erreur peut être faible avec les anticoagulants puissants qui agissent à très petites doses, elles deviennent importantes avec le citrate de soude, et encore plus avec l'oxalate de potassium ou le fluorure de sodium qui agissent à doses relativement élevées.

Certains auteurs américains [426] ont remarqué l'inexactitude des dosages de protéides pratiqués sur le sang additionné d'anticoagulants en poudre. Mais sans étudier en détail les causes de cette incorrection, ils ont essayé d'y remédier en utilisant les anticoagulants en solution hypertonique (citrate de Na saturé), méthode qui n'est pas plus exacte. Ils se contentent de ces chiffres d'autant plus qu'ils admettent, d'après les travaux de Scott, de Bellis et Scott et de Lehman et Scott, le passage réversible des protéides du plasma vers les globules sous l'influence de la variation de tonicité du milieu.

D'après tout ce qui a été exposé ici, il ressort qu'il est nécessaire de modifier les méthodes courantes de dosage des protéides du plasma suivant les règles suivantes :

1° Le procédé le meilleur est sans aucun doute de pratiquer le dosage des protéides du plasma avec du sang non traité par un anticoagulant. Mais la récolte de plasma frais présente des difficultés techniques parfois insurmontables avec le sang de la plupart des mammifères, qui se coagule rapidement. Elles augmentent parfois encore s'il s'agit de sang pathologique.

2° Pour évaluer la quantité de protéine par unité de volume de plasma, on peut se servir de l'héparine en dilution de 0,75 p. 100 à 2,5 p. 100 qui ne donne pas d'erreur appréciable, au moins pour le sang de lapin. Il suffit d'ajouter 0 c. c. 1 ou 0 c. c. 2 pour 10 cent. cubes de sang. Cependant, comme nous le savons par les travaux de Fischer, l'héparine, en modifiant le point iso-électrique des protéides, fausse tous les résultats dans les séparations qu'on utilise couramment au laboratoire pour obtenir les globulines ou différentes fractions globuliniques des albumines.

Les dosages du plasma frais ou du plasma hépariné permettent d'évaluer la quantité de protéines par unité de volume du plasma.

3° Les résultats obtenus par le dosage des protéides d'un plasma additionné d'anticoagulant en poudre ou en solution ne s'appliquent exactement qu'au volume du sang total. A cet effet, on mesure le volume globulaire quand on emploie l'hématocrite pour obtenir des résultats corrects ; il faut régler une fois pour toutes et maintenir constants à la fois le temps et la vitesse de centrifugation. Ayant obtenu la valeur relative du plasma par rapport aux globules, on multiplie celle-ci par la quantité de protéides trouvés dans 1 cent. cube. Si l'on a opéré avec un anticoagulant en solution, il faut évidemment apporter dans le calcul la correction qui convient pour le surplus du volume ajouté. L'erreur d'expérience est tout au plus de 1 à 2 p. 100.

Les dosages pratiqués avec les deux premières méthodes

permettent d'évaluer directement la quantité de protéïdes contenues dans l'unité de volume du plasma.

Par la troisième nous ne mesurons plus les protéïdes par unité de volume du plasma, mais nous reportons le résultat sur le volume du sang total. Au point de vue physiologique, il est au moins aussi important de connaître la valeur des protéïdes dans le sang que dans une unité de volume du plasma.

18° Influence de la perméabilité globulaire sur le taux des protéïdes du sérum.

Dans le premier chapitre, nous avons indiqué les résultats du dosage, sur un même animal, des protéïdes du sérum et du plasma sanguin ; ce dernier a été obtenu par centrifugation rapide, dans des tubes paraffinés, du sang non additionné d'anticoagulants. Dans ces conditions, le plasma se montre constamment plus riche en protéïdes que le sérum correspondant : le taux des protéïdes sériques étant de 4 à 9 grammes par litre ou de 7 à 16 p. 100 plus faible que celui du plasma. Il est difficile de concevoir qu'une telle diminution de protéïdes soit uniquement due à l'élimination de la fibrine qui représente habituellement de 0.2 à 0.4 p. 100 des protéïdes totaux du plasma [133, 145]. Nous avons pensé qu'il existe peut-être un échange d'eau entre les globules et le milieu environnant au cours de la coagulation.

a) MOMENT DE LA SÉPARATION DU SÉRUM DU CAILLOT SANGUIN.
— Pour étudier cette question, nous nous sommes assuré d'abord que la richesse du sérum en protéïdes reste constante et ne dépend pas du temps de contact du sérum avec le caillot. Les indications bibliographiques recueillies sur ce sujet sont contradictoires. Kylin, soit seul, soit avec Kristenson [106-108], a trouvé que la composition du sérum varie sensiblement suivant le temps de contact avec le caillot. Ainsi il trouve que dans le sérum, le taux des protéïdes totaux subit des variations allant jusqu'à 30 p. 100. La fraction

albuminique diminue et la fraction globulinique augmente pendant les premières heures après la coagulation du sang. Ce travail a été sévèrement critiqué par Bing [15], qui ne trouve aucune modification du taux des protéides totaux du sérum, prélevé du caillot à des moments différents après la coagulation du sang. Il ne confirme pas non plus les variations du rapport albumine/globuline, observées par Kylin.

Toutes nos expériences ont donné des résultats identiques à ceux de Bing et, par suite, contraires à ceux de Kylin. Voici, à titre d'exemple, un de nos dosages.

EXPÉRIENCE N° 45. — On saigne un lapin à la carotide. On prélève le sang dans cinq tubes à essai bien propres, lavés au mélange sulfochromique, à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et séchés à l'étuve. Les tubes, aux trois-quarts remplis de sang, sont bouchés au caoutchouc et conservés à la température du laboratoire. Chaque tube nous sert pour un prélèvement de sérum fait à des temps différents après la coagulation du sang. Le sérum a été chaque fois centrifugé pour éliminer les globules rouges. Le dosage d'azote protéidique a fourni les résultats suivants :

	PROTÉIDES par litre de sérum en grammes	VARIATION en p. 100
<i>Sérum séparé du caillot :</i>		
Deux heures après la prise de sang	62,2	
Quatre heures après la prise de sang	62,2	
Huit heures après la prise de sang.	62,0	— 0,32
Vingt heures après la prise de sang	62,2	

Le dosage de quarante-huit heures n'a pas pu être pratiqué, le plasma étant déjà légèrement coloré par l'hémoglobine.

Il résulte de cette expérience, comme l'a vu déjà Bing, que la concentration du sérum en protéides totaux ne dépend pas du temps de contact de celui-ci avec le caillot, les résultats restent constants quand on sépare le sérum de deux à vingt heures au moins après la prise de sang. Il est évident que cela ne s'applique qu'aux sangs conservés dans des conditions identiques.

b) LE SÉRUM PROVENANT DU SANG TOTAL EST PLUS PAUVRE EN PROTÉIDES QUE CELUI QUI PROVIENT DU PLASMA SÉPARÉ DES GLOBULES ROUGES. — Nous avons vu que le sérum est sensible-

ment plus pauvre en protéïdes que le plasma du même sang. Par les expériences suivantes, nous avons voulu savoir si le sérum provenant de la coagulation du sang total conserve en protéïdes la même concentration que le sérum résultant de la coagulation du plasma séparé des globules rouges avant la coagulation. Ce procédé nous permettrait de décider s'il existe un échange d'eau entre les globules et le plasma au cours de la coagulation et nous expliquerait la diminution très forte de la concentration en protéïdes du sérum que nous avons constatée.

EXPÉRIENCE N° 46. — On saigne un lapin à la carotide. Une partie du sang est recueillie dans un tube paraffiné et rapidement centrifugée. On répartit le plasma ainsi obtenu en deux tubes à essai dans lesquels on le laisse coaguler. Nous recueillons, d'autre part, une égale quantité de sang directement dans deux tubes à essai. On pratique une première analyse de chacun des deux sérums deux heures après la prise de sang, et une deuxième vingt-quatre heures plus tard. Les deux analyses faites à vingt-deux heures d'intervalle nous montrent que la teneur en protéïdes du sérum ne varie pas plus au contact du caillot pour celui qui provient du plasma que pour celui qu'on retire du sang total, comme nous l'avons constaté déjà pour le sérum du sang total:

	PROTÉIDES par litre de sérum en grammes	VARIATIONS en p. 100
<i>Sérum du sang, séparé :</i>	—	—
Deux heures après la prise de sang	64,9	
Vingt-quatre heures après la prise de sang. . .	64,9	
<i>Sérum du plasma, séparé :</i>		
Deux heures après la prise de sang	68,9	+ 6,2
Vingt-quatre après la prise de sang	68,8	+ 6,0

L'expérience n° 47 est faite de la même façon que l'expérience précédente, sauf que nous avons fait le dosage sur le sérum séparé quatre heures après la prise de sang.

	PROTÉIDES par litre de sérum en grammes	VARIATION en p. 100
Sérum provenant du sang total	71,0	
Sérum provenant du plasma.	72,3	+ 1,8

Ces deux expériences nous montrent que le sérum du sang total est moins riche en protéïdes que celui du plasma. Il se produit donc au cours de la coagulation, un passage d'eau du globule vers la phase extérieure. La perméabilité de la paroi globulaire n'est pas complètement altérée après coagulation et elle doit permettre d'observer une diminution de la concentration en protéïdes du sérum si l'on change la concentration moléculaire du plasma.

c) UNE MODIFICATION DE LA CONCENTRATION MOLÉCULAIRE DU PLASMA AVANT COAGULATION DU SANG AGIT SUR LE TAUX DE PROTÉÏDES SÉRIQUES.

EXPÉRIENCE N° 48. — On saigne un lapin à la carotide. Le sang est séparé en deux tubes à essai. Dans un tube on ajoute 1 cent. cube d'une solution de NaCl à N/10 pour 10 cent. cubes de sang, dans l'autre 1 cent. cube d'une solution de NaCl N pour la même quantité de sang. On mélange bien et on ferme les tubes au caoutchouc pour éviter l'évaporation. On sépare le sérum au bout de vingt heures. Nous avons ajouté dans cette expérience le sel en solution pour éviter l'hémolyse des globules rouges.

	PROTÉÏDES par litre de sérum en grammes	VARIATION en p. 100
Sérum du sang additionné de NaCl à N/10 . . .	52,9	—
Sérum du sang additionné de NaCl N	48,1	— 8,4

On voit donc que la paroi globulaire garde encore les propriétés caractéristiques d'une membrane semi-perméable et l'eau des globules passe dans le plasma, plus facilement que les sels du plasma dans les globules.

d) LA DIMINUTION DE LA CONCENTRATION EN PROTÉÏDES DU SÉRUM PAR RAPPORT AU PLASMA RELÈVE DE DEUX MÉCANISMES DIFFÉRENTS. — La diminution du taux des protéïdes du sérum par rapport au plasma est par conséquent due non seulement à la formation de la fibrine, mais aussi à la dilution du sérum par l'eau des globules. On peut étudier ces deux phénomènes simultanément sur un même sang si, en comparant le sérum obtenu par coagulation du sang total avec celui du plasma séparé des globules rouges avant coagulation, on détermine

la dilution du sérum due à la dilution par l'eau de globules. Si nous comparons les chiffres obtenus par dosage du plasma frais et du sérum provenant de ce plasma, nous déterminons la diminution due à la coagulation de la fibrine. Voici deux de nos expériences.

EXPÉRIENCE N° 49 faite sur le sang de lapin.

	PROTÉIDES par litre en grammes	DIFFÉRENCE en p. 100
Plasma du sang non additionné d'anticoagulants	74,0	—
Sérum provenant de ce plasma	72,2	— 2,43
Sérum provenant du sang total	71,0	— 4,05

EXPÉRIENCE N° 50 faite aussi sur le sang de lapin.

Plasma du sang non additionné d'anticoagulants	60	
Sérum provenant de ce plasma	57,5	— 4,16
Sérum provenant du sang total	55,2	— 8,00

Dans les conditions de nos expériences, la diminution du taux de protéides au cours de la coagulation est environ deux fois plus grande en présence de globules rouges que dans le plasma seul.

La différence du taux de protéides entre le plasma et le sérum provenant de ce plasma, correspond à l'élimination de la fibrine. Cette différence dans nos expériences varie de 2 à 5 grammes par litre, ce qui fait de 200 à 500 milligrammes de fibrine par 100 cent. cubes de plasma, chiffres sensiblement comparables à ceux qu'on trouve en dosant directement la fibrine par d'autres méthodes. Cette estimation de la quantité de fibrine est probablement plus sûre que celle des auteurs américains, basée sur la recalcification du plasma du sang préalablement décalcifié par l'oxalate. Par cette méthode, l'addition d'anticoagulants ne dilue pas le plasma et écarte les causes d'erreurs dues à la difficulté très grande qu'entraîne la séparation de la fibrine des autres protéides.

Starlinger [180], dans deux travaux très documentés, critique sévèrement les différentes méthodes de dosage de la fibrine. Le fibrinogène qu'on dose par recalcification n'est pas

identique au fibrinogène naturel qui se forme au moment de la coagulation spontanée du sang. D'après lui, la meilleure façon de doser le fibrinogène consiste à faire la comparaison réfractométrique du plasma et du sérum provenant de ce plasma.

Guillaumin [66] estime qu'il est impossible de chercher à mesurer le fibrinogène par différence entre le sérum du sang et le plasma du même sang additionné d'anticoagulant salin, qui apporte une perturbation dans la répartition de l'eau entre les globules et le plasma. Ajoutons que la comparaison doit être faite entre le plasma du sang non modifié et le sérum provenant de ce plasma, et non pas le sérum du sang total.

e) C'EST LE DÉPART DE L'ACIDE CARBONIQUE QUI RÉGIT LA DILUTION DU SÉRUM AU COURS DE LA COAGULATION. — Pour étudier le mécanisme de la dilution du sérum au moment de la coagulation, nous avons pensé que le départ de l'acide carbonique qui se produit constamment dès que le sang est exposé à l'air, pouvait introduire une perturbation dans la concentration moléculaire du sang. Pour que la dilution du sérum puisse se manifester, c'est la concentration moléculaire qui entraîne la dilution du sérum, celui-ci augmente par rapport à celle des globules rouges. D'autre part, d'après la théorie déjà ancienne de Hamburger [71 et 73], il ressort que quand le sang s'enrichit en CO_2 , le volume globulaire augmente et le plasma se concentre. Le phénomène inverse se produit au moment du départ de l'acide carbonique du sang.

Les expériences que nous avons faites nous ont apporté une confirmation partielle de cette théorie. Voici comment nous avons procédé.

EXPÉRIENCE N° 51, faite sur le sang de lapin. — On prélève par ponction du cœur chez un lapin, 20 cent. cubes de sang avec une seringue dans laquelle nous avons introduit, avant l'opération, quelques cent. cubes d'huile de paraffine pour éviter le contact du sang avec l'air. Le sang est porté dans un tube à centrifugation contenant 0 c. 10 d'une solution d'héparine à 5 p. 100, recouverte d'une couche de 3 centimètres d'huile de paraffine. On introduit l'aiguille de la seringue jusqu'au fond du tube, de telle sorte que le sang qui

arrive dans le tube se trouve placé toujours sous une couche d'huile. Dans un deuxième temps, on prélève du sang avec une seringue ordinaire et on le verse dans un verre qu'on place dans un exsiccateur contenant au fond une solution de potasse caustique à 1 p. 100 pour absorber l'acide carbonique. On ferme bien l'exsiccateur et on laisse le sang ainsi pendant trois heures à la température du laboratoire. On conserve pendant le même temps à la même température, le sang recouvert d'huile. Puis on centrifuge les deux tubes et on analyse le plasma.

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATION en p. 100
Sérum sous huile de paraffine	68,4	—
Sérum conservé dans une atmosphère privée de CO ²	66,9	— 1,76

On voit que réellement le sang qui a perdu plus d'acide carbonique est plus pauvre en protéides. Nous disons plus d'acide carbonique car l'huile de paraffine n'arrête pas complètement le départ de l'acide carbonique.

Nous avons répété ces expériences plusieurs fois sur le plasma avec des résultats identiques. Ensuite nous avons vérifié que le sérum se comporte de façon identique. Pour en être sûr, nous avons fait plusieurs témoins pour éliminer l'action de la dessiccation ou humidification du sérum. Voici une de nos expériences.

EXPÉRIENCE N° 52, faite sur le sang de mouton. — On prélève une cinquantaine de cent. cubes de sang de mouton qu'on répartit par 10 cent. cubes environ de la façon suivante : 10 cent. cubes sont recueillis dans un tube à essai bouché au caoutchouc. Les 40 autres cent. cubes sont répartis par 10 cent. cubes dans des boîtes de Petri qui sont successivement mises ouvertes dans un exsiccateur bien fermé, mais dans lequel on ne fait pas le vide. Pour la première, on place au fond de l'exsiccateur une couche d'eau pour étudier l'influence de la vapeur d'eau ; pour la deuxième au lieu d'eau on met une couche d'acide sulfurique pour voir l'influence de la dessiccation, pour la troisième une solution de 2 p. 100 de potasse caustique qui absorbera l'acide carbonique et pour la quatrième, on fait passer un courant d'acide carbonique.

Tous ces échantillons sont ensuite centrifugés et on dose les protéides du sérum par la méthode habituelle.

	PROTÉIDES par litre de plasma en grammes	VARIATIONS en p. 100
Sérum du sang conservé dans les tubes à essai bouchés au liège	78,2	—
Sérum du sang conservé dans une atmosphère de vapeur d'eau	78,2	0
Sérum du sang conservé dans une atmosphère sèche.	80,9	+ 3,45
Sérum du sang conservé dans une atmosphère d'acide carbonique	75,1	— 3,96
Sérum du sang conservé dans l'atmosphère privée de CO ²	74,2	— 5,13

Il est nécessaire de faire la séparation du sérum au moins six à sept heures après la prise de sang pour se placer dans des conditions similaires pour tous les échantillons. Il est évident que dans une boîte de Petri CO² part très vite, alors qu'il lui faut plus de temps pour s'éliminer d'un tube.

Cette expérience montre que le sang conservé dans une boîte de Petri en atmosphère humide présente le même taux de protéides que le sang témoin conservé dans des tubes à essai bouchés. La dessiccation, d'autre part, augmente la concentration du sérum en protéides, comme il fallait s'y attendre. Si le départ d'acide carbonique produit une dilution du plasma, un excès de CO² provoque le même effet. Il existe par conséquent une concentration en CO² du sang qui correspond au plus fort volume globulaire. Une diminution ou une augmentation de la pression partielle de ce gaz dans le sang provoque la diminution du volume globulaire et la dilution du plasma ou du sérum par l'eau globulaire. L'hypothèse de Hamburger ne s'applique donc que dans les limites très étroites correspondant au voisinage de la pression physiologique normale de CO².

La pression de CO² augmente, le plasma ou le sérum se diluent sans qu'on puisse invoquer une précipitation partielle des protéides par acidification. En effet, le pH du sérum conservé dans une atmosphère de CO² ne baisse pas, dans nos expériences, au-dessous de 7,2-7,3, pH normal du sang.

Nous pouvons dire, en définitive, que le départ de l'acide carbonique diminue la teneur en protéides du sérum et que la dessiccation l'augmente.

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE HISTORIQUE

Rôle des anticoagulants dans le dosage et la répartition des divers constituants du sang entre les globules et le plasma.

Après avoir étudié l'action perturbatrice des anticoagulants sur divers dosages, nous allons passer en revue rapidement la littérature qui existe sur ce sujet.

I. — DOSAGES DE PROTÉIDES.

Nous n'avons pas l'intention de passer en revue la longue liste des travaux qui ont nécessité le dosage des protéides du plasma sanguin pour des recherches chimiques, physiques, médicales et physiologiques. Nous nous bornerons à examiner les méthodes employées pour séparer le plasma, les répercussions que l'usage des anticoagulants entraîne sur l'exactitude des résultats obtenus et nous nous efforcerons d'expliquer les divergences de certains de ces travaux en signalant les causes d'erreur qui les ont provoquées.

On peut classer les méthodes de dosage des protéides du plasma en quatre groupes :

1° Méthodes gravimétriques : pesée des protéides après précipitation par un réactif approprié, le plus souvent l'acide trichloracétique et lavages ultérieurs pour enlever les impuretés.

2° Méthodes volumétriques : dosage de l'azote protéidique

par la méthode de Kjeldahl. C'est de beaucoup la méthode la plus simple et la plus précise, c'est aussi la plus répandue.

3° Méthode colorimétrique proposée par Wu ; libération de la tyrosine par hydrolyse des protéides et dosage colorimétrique de cet acide aminé.

4° Méthodes réfractométriques : mesure de l'indice de réfraction du plasma.

Nous ne croyons pas devoir examiner tous ces travaux suivant cette classification, car ce qui nous intéresse c'est que, presque toujours, les auteurs ne se sont pas préoccupés de la façon dont le plasma était obtenu, et c'est là le point spécial sur lequel nous voulons attirer l'attention.

Pourtant, il existe quelques travaux traitant de l'action perturbatrice des anticoagulants sur les dosages de protéides.

Cullen et Van Slyke [30] ont remarqué que des variations de concentration du sang en oxalate entraînent des variations du taux d'azote total du plasma. Ils proposent, pour avoir des résultats comparables, d'utiliser toujours la même concentration en oxalate. Cependant, nous avons vu que le sang ne répond pas toujours d'une façon identique à l'addition d'une dose constante d'anticoagulant et ces variations individuelles ne sont pas négligeables.

Peters, Eisenman et Bulger [143] en 1925, ont trouvé moins de protéides dans le plasma du sang oxalaté que dans le sérum provenant du même sang. Ils attribuent ce résultat paradoxal à l'action de l'anticoagulant.

Guillaumin [66] en 1930, indique que l'addition d'anticoagulant au sang apporte une modification dans la distribution de l'eau entre les globules et le plasma. Il le démontre par des dosages de chlorures globulaire et plasmatique.

Gaebler [56] en 1932, remarque que le plasma du sang additionné d'anticoagulants salins contient moins d'azote total que le sérum. L'auteur explique ce fait par l'action diluante des sels ajoutés.

Enfin, Blitstein [16] en 1935, dans un long travail, a étudié l'action des anticoagulants dans les dosages courants que l'on pratique sur le sang en clinique. Il confirme pour les anticoagulants salins les résultats des auteurs précités : tous ces

corps diminuent le taux des protéides du plasma. Comme terme de comparaison, il se sert du sérum du sang défibriné, ce qui entraîne forcément une inexactitude que l'auteur reconnaît lui-même. En revanche, il ne trouve pas de différence dans le taux protéidique du plasma quand il utilise le sang hépariné, liquoïdé ou hirudiné, et ceci parce que ces trois corps, utilisés à de très petites doses donnent, comme nous l'avons vu, une dilution du plasma beaucoup plus faible que les anticoagulants salins.

Malgré l'évidence de ces travaux, de nombreux auteurs, comme auparavant, attachent si peu d'importance aux anticoagulants utilisés, qu'ils n'en indiquent même pas le nom, ni la dose employée. On peut citer parmi ceux-là, dans des travaux récents : Bruger et Poindexter [22] et Leichsering et ses collaborateurs [412] qui ont fait des dosages de protéides et des mesures de volume globulaire sur le sang de chien.

Cependant, la plupart des auteurs précisent la nature de l'anticoagulant utilisé, mais n'en indiquent pas la dose. Il est évident que tous les résultats de dosages obtenus par eux restent au-dessous de la réalité. Une différence d'origine du sang et surtout la moindre variation dans la dose d'anticoagulant apportent des troubles considérables. L'absence de précision dans les doses employées laisse croire que, pour chaque expérience, celle-ci varie et qu'il en est de même de l'erreur commise. Ces considérations s'appliquent aux travaux de Barnett, Jones et Cohn [5] qui ont employé le citrate de soude. Ne mesurant pas le volume globulaire, il leur est impossible de rapporter leurs résultats au volume du sang total, pour corriger l'action de l'anticoagulant. Ne serait-ce pas à cette raison qu'il faille attribuer la non-concordance de leurs observations avec celles d'autres auteurs. Whipple et ses collaborateurs par exemple, qui, au contraire d'eux, trouvent une diminution des protéides sanguins par la plasmaphorèse ? De même Linder, Lundsgaard et Van Slyke [418] recherchent la teneur en protéides du plasma chez les sujets normaux et les néphrétiques, sans préciser la dose d'oxalate utilisée. Swanson et Smith [482] trouvent que le plasma sanguin du rat s'enrichit

en protéides avec l'âge de l'animal, mais leurs chiffres restent certainement au-dessous du taux réel, car ils utilisent le plasma oxalaté en indiquant tout juste que l'anticoagulant a toujours été employé de la même manière.

II. — DILUTION DU SANG APRÈS ABSORPTION D'EAU.

Quand il s'agit de phénomènes entraînant de faibles variations dans la teneur des protéides, comme par exemple la dilution du sang après ingestion d'eau, l'erreur commise au cours de la séparation du plasma peut être supérieure à la différence cherchée. C'est probablement pour cette raison que sur ce sujet les résultats sont les plus contradictoires. Certains auteurs comme Haldane et Priestley [69] en 1916, Priestley [155] en 1916 et 1921, ne trouvent pas de différence dans la concentration du sang en protéides avant et après absorption d'eau ou d'eau salée. Ils n'indiquent pas d'ailleurs la technique opératoire. Par contre, Bayliss et Fee [7], sans donner plus de détails sur la technique, observent des résultats contraires. Rioch [160], en travaillant sur le sang recueilli dans des tubes paraffinés et non additionné d'anticoagulant, donc en évitant les erreurs que nous avons signalées, constate une chute de la concentration des substances dissoutes dans le plasma après ingestion d'eau. Aux mêmes résultats arrivent Adolph en 1921, Marx en 1925-1927, Marx et Mohr [132] en 1927, Dresel et Leitner [39] en 1928, Brahn et Bilschowsky en 1928.

Hemingway, Collins et Bernhart [84] ont étudié la dilution du sang à la suite de l'injection intraveineuse d'eau physiologique chez le chien normal et le chien éviscéré. Le degré de dilution du sang a été évalué par trois méthodes différentes : 1° par dosage d'hémoglobine, 2° par dosage des protéides du plasma, 3° par tests des colorants vitaux. Ils remarquent d'ailleurs que ces trois procédés ne donnent pas une réponse identique. Le dosage d'hémoglobine fournit des résultats moins élevés que ceux qu'on obtient par dosage des protéides plasmatiques et par ces derniers moins encore que par les tests de colorants vitaux. C'est ainsi que dans une expérience, pratiquée deux heures après l'injection d'eau, les auteurs

trouvent par dosage de l'hémoglobine une dilution du sang de 20 p. 100, de 40 p. 100 par dosage des protéides plasmatiques et de 70 p. 100 par l'emploi de colorants. Ils en arrivent à cette conclusion qu'il est impossible de savoir laquelle de ces trois méthodes donne un résultat exact et même si l'une d'entre elles convient. Ajoutons encore que pour opérer le dosage des protéides et pour utiliser les colorants vitaux, ils oxalatent le sang avec une solution qu'ils qualifient d'isotonique sans autre précision. Pour le dosage de l'hémoglobine, ils ajoutent au sang de l'oxalate en poudre sans indiquer la dose, bien qu'à la vérité, celle-ci ait ici peu d'importance puisqu'ils opèrent sur le sang total.

Smirk [173], d'après ces expériences, admet qu'il existe réellement une dilution du sang après ingestion d'eau. Mais la méthode qu'il utilise enlève une grande valeur à ses résultats. En effet, il procède à la détermination du volume globulaire, au dosage du chlore et de l'hémoglobine en héparinant le plasma, opération qui provoque, comme nous le savons, une faible dilution de cette humeur. Pour le dosage des protéides du plasma, il opère sans indiquer le taux d'oxalate qu'il emploie et sans tenir compte des perturbations beaucoup plus importantes que comporte cet anticoagulant. La dilution du plasma a donc été différente dans chaque cas. De plus, toute correction dans le chiffre des protéides devient impossible puisque la mesure du volume globulaire est faite sur le plasma hépariné et le dosage d'azote protéidique sur le plasma oxalaté.

Nous retrouvons aussi l'utilisation de deux anticoagulants dans les recherches sur la plasmophorèse faites par Holman, Mahoney et Whipple en 1934 [90]. Ces auteurs ont dosé les protéides du plasma sur le sang citraté à la dose de 1 cent. cube d'une solution de citrate « concentrée » pour 30 cent. cubes de sang, alors que les lectures à l'hématocrite ont porté sur le sang oxalaté avec une solution isotonique d'oxalate.

Il est évident que cette technique malheureuse ne permet de calculer ni le taux réel, ni la quantité de protéides dans un échantillon donné de sang. D'ailleurs Whipple et ses collaborateurs [126 et 146] ont pressenti la défectuosité de

leur méthode et dans leurs expériences ultérieures, ils ne font usage que d'un seul anticoagulant pour toutes leurs mesures, à savoir le citrate de soude en solution saturée à raison de 1 cent. cube pour 100 cent. cubes de sang. Leurs expériences montrent que chez le chien, une teneur du plasma en protéides inférieure à 4 p. 100 provoque des œdèmes et des accidents variés, alors qu'au-dessus de ce taux, l'organisme commence à mettre des protéides en réserve. En réalité, le taux critique est de 5 à 10 p. 100 plus élevé, en raison de l'action diluante du citrate de soude sur le plasma.

III. — MESURE DU VOLUME TOTAL DU SANG.

Plusieurs méthodes ingénieuses ont été proposées pour mesurer le volume total du sang, du plasma ou des globules rouges de l'organisme.

Pour le volume total du sang, le procédé le plus simple consiste à faire une saignée complète de l'animal [21], mais même en pratiquant un lavage des vaisseaux, on n'est jamais sûr d'en avoir extrait la totalité.

L'injection de colorants vitaux dans la circulation et la détermination quantitative de ces substances dans un volume donné de sang, prélevé quelques instants après l'injection du colorant permettrait, d'après Keith, Rowntree, Geraghty, inventeurs de la méthode [100], de déterminer le volume total du sang. A la place des colorants vitaux, on a proposé les immuns-sérums : Dreyer et Ray [40] se sont servis du sérum agglutinant, Behring [40] du sérum antitoxique, Todd, White et Ashby [184] du sérum hémolytique, Culberston [29 bis] de sérum précipitant. Ces méthodes ne sont pas sans reproches. Sans parler de la fixation possible de ces substances dans les tissus de l'organisme, cause d'erreur à laquelle les différents auteurs ont essayé de remédier, l'emploi d'anticoagulant pour la séparation du plasma entraîne des erreurs considérables. Le plasma, dilué par l'action de l'anticoagulant, renferme une quantité du test injecté inférieure à la réalité, et de ce fait le volume du plasma calculé est trop fort. On n'élimine pas non plus cette cause d'erreur en travaillant sur le sérum, car

premièrement, l'eau globulaire, comme nous l'avons vu, dilue le sérum au moment de la coagulation, et deuxièmement la détermination du volume du plasma par rapport à celui des globules rouges à l'aide de l'hématocrite, oblige à additionner le sang d'anticoagulant. Dès lors, le volume du plasma trouvé à l'hématocrite ne correspond pas au volume du sérum, et l'on voit quelle répercussion cette pratique peut avoir sur le calcul du volume du sang total.

Cutting et Cutter [31] déterminent le volume total du sang par perfusion en utilisant, pour les mesures du volume plasmatique à l'hématocrite, le sang additionné d'une solution saturée de citrate. Le volume du plasma ainsi calculé par rapport à la surface totale du corps, est loin d'être correct.

Powers, Bowie et Howard [153] essaient de mesurer le volume total du sang, ceux du plasma et des globules rouges chez le chien. Pour cela, ils utilisent la méthode des colorants vitaux. Pour les mesures à l'hématocrite et pour les dosages colorimétriques, ils recueillent le sang sur du citrate de sodium sec à raison de 3 gr. 6 par litre de sang. Ils trouvent le rapport du poids du sang total, à celui de l'animal égal à 41,94 p. 100. En travaillant aussi sur le chien, Harris [78] trouve, pour ce rapport, une valeur de 7.6 p. 100. L'anticoagulant employé par cet auteur était l'oxalate en poudre. Ce n'est pas parce qu'il a tenu compte de l'action diluante de l'oxalate qu'Harris a trouvé un rapport plus faible que celui des auteurs précédents, mais par suite de l'introduction d'une correction portant sur le fait qu'une partie du colorant passe dans la lymphe et les tissus ou s'élimine par l'urine.

En réalité, le rapport du volume du sang total au poids du corps serait encore plus faible si les auteurs avaient pris en considération l'action des anticoagulants.

IV. — DOSAGE DE LA FIBRINE.

Nous ne parlerons pas des méthodes de dosage anciennes qui ont été reconnues peu satisfaisantes, mais nous examinerons seulement les plus récentes. Presque toutes sont basées sur la recalcification du plasma provenant du sang préalable-

ment décalcifié. Etant donné la petite quantité de fibrine contenue dans le sang, l'erreur commise est trop faible pour que les auteurs aient perçu l'influence des anticoagulants.

Cullen et Van Slyke [30] utilisent comme décalcifiant l'oxalate de potassium en poudre à raison de 5 grammes p. 1.000. Wu se sert du même sel, mais à la dose de 2 à 6 grammes p. 1.000. Avec ces méthodes, une première cause d'erreur est due à l'utilisation du décalcifiant en poudre et cette erreur est plus grande que par le procédé de Foster et Whipple [53] ou celui de Schultz et ses collaborateurs [169] qui emploient l'oxalate en solution de 1 à 2 p. 100 et qui, par conséquent, modifient moins le volume globulaire.

Une seconde cause d'erreur provient du procédé d'isolement de la fibrine. Pour cette opération, une quantité déterminée de plasma est introduite dans une solution contenant un excès de sels de calcium. La fibrine précipitée est séparée soit par centrifugation, soit par expression du culot, soit enfin par enroulement de la fibrine sur une baguette de verre. La fibrine est ensuite rincée à l'eau salée et évaluée par pesée directe ou par dosage de l'azote.

Cette méthode manque de précision car on n'est pas sûr d'avoir précipité toute la fibrine, ni de ne pas avoir apporté d'autres protéïdes adsorbés sur celle-ci. Wu [198] d'une part, Jones et Smith [99] d'autre part, pour améliorer le rendement en fibrine ajoutent de la céphaline qui favorise la coagulation de cette substance. Ces deux derniers auteurs indiquent que la quantité de fibrine précipitée diffère avec le pH du milieu.

Starlinger [180], dans deux travaux très importants, étudie en détail les différentes méthodes de dosage de la fibrine. D'après ce savant, les dosages basés sur le principe de la recalcification du sang oxalaté comme ceux de Cullen et Van Slyke [30], de Gram [62], de Foster et Whipple [53], de Howe [85], de Lester [114], de Leendertz et Gromelsky [110], de Pfeiffer et Koster [144], de Porgès et Spiro [152], n'indiquent que la teneur du plasma en « fibrine saline » qui n'est pas identique à celle que l'on peut obtenir par coagulation spontanée du sang.

Une autre méthode consiste à se servir du procédé peu correct de comparaison entre le plasma et le sérum d'un même sang. En effet, Starlinger a vu que la concentration en protéïdes du sérum diffère suivant qu'il provient du sang ou du plasma. D'après lui, la meilleure façon de doser la fibrine est la méthode réfractométrique : celle-ci consiste à comparer au réfractomètre le plasma additionné d'anticcagulant après séparation des globules rouges et le sérum provenant de ce plasma. La différence trouvée indique la quantité de fibrine contenue dans le plasma. Guillaumin [66], de même, signale qu'il est impossible de doser la fibrine par différence entre le sérum et le plasma salifié.

D'après tout ce que nous savons de l'action des anticoagulants, il ressort que la meilleure méthode de dosage de la fibrine consiste à mesurer la teneur relative en protéïdes du plasma et du sérum provenant de ce plasma, sans se servir d'anticoagulants.

V. — RAPPORT ENTRE LA SÉDIMENTATION GLOBULAIRE ET LA TENEUR DU SANG EN DIVERS PROTÉÏDES.

Ordinairement, on mesure la vitesse de sédimentation des globules rouges sur le sang citraté, à 3 ou 4 p. 1.000.

Nous trouvons une observation intéressante dans le travail de Ström [181] qui compare la vitesse de sédimentation des globules dans le sang hépariné et le sang citraté d'un même individu. Cet auteur trouve une vitesse de sédimentation plus rapide dans le sang citraté et il en conclut que l'héparine doit altérer les protéïdes plasmatiques. Il nous semble beaucoup plus logique de considérer que la vitesse de sédimentation est fonction de la viscosité différente du plasma citraté et du plasma hépariné, ce dernier, moins dilué que le premier, jouissant d'une viscosité plus grande.

Nombreux sont les auteurs qui ont cherché un rapport entre les divers protéïdes plasmatiques et la vitesse de sédimentation globulaire. D'après les uns, dont Snapper [175], ce phénomène est régi par la fraction globulinique, y compris le fibrinogène. Au contraire, Reiche et Fretwurst [157] ne trou-

vent aucun rapport entre la vitesse de sédimentation et la teneur du plasma en divers protéides. Leurs dosages ont été faits sur le sang fluoré sans indication de titre et nous savons que cet anticoagulant donne les erreurs les plus considérables ; notons encore que les doses de fluorure ne sont pas indiquées et que si elles n'ont pas été les mêmes à chaque détermination, il faut vraiment accueillir ces résultats avec réserve.

Swedin [183], qui opère sur le sang additionné d'une solution hypertonique de citrate ne tient pas plus compte de l'action du sel employé sur le dosage des protéides.

VI. — ETUDE DE LA DISTRIBUTION DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES ENTRE LE PLASMA ET LES GLOBULES ROUGES.

Nombreux sont les auteurs qui se sont préoccupés de la répartition, entre le plasma et les globules rouges, de différentes substances, soit qu'elles existent normalement dans le sang, soit qu'on les y ajoute. Le plus grand nombre de travaux sur ce sujet ont été faits sur le sang additionné d'anticoagulants. Le problème est ici plus complexe que pour les protéides, substances non diffusibles, car, outre l'eau, plusieurs corps peuvent passer des globules rouges dans le plasma et *vice versa*. Pour les corps très facilement diffusibles tels que l'urée qui, comme nous l'avons vu, ne modifie que peu ou pas le volume globulaire, l'action diluante de l'anticoagulant influe peu sur la concentration plasmatique de ces corps. Cependant si l'on calcule le rapport de l'urée globulaire et de l'urée plasmatique, ce rapport sera faussé par diminution du volume globulaire due à l'anticoagulant.

GLUCOSE. — Folin [49], pour l'étude de la répartition du glucose dans le sang, conseille d'utiliser l'oxalate de potassium ou de lithium. De même, Benedict et Behre [11, 12] prennent l'oxalate de sodium en poudre.

Le travail d'Olmsted [141], où l'on trouve des conclusions surprenantes, est un type de ces travaux où l'interprétation des résultats faussés par l'action des anticoagulants, donne lieu à des erreurs manifestes. L'auteur procède de la manière

suivante : un premier dosage du glucose est pratiqué sur le sang total et sur le plasma provenant de ce sang par centrifugation rapide. Le volume globulaire est déterminé à l'hématocrite sur le sang oxalaté, sans indication de titre. Cette mesure n'est faite qu'une fois pour toutes et cependant l'auteur indique qu'il trouve le même volume globulaire pour le sang frais et pour le sang oxalaté, ce qui est assurément erroné. Le volume plasmatique du sang frais est de beaucoup inférieur au volume plasmatique du sang oxalaté. La teneur en glucose plasmatique du sang frais calculée sur les données de cette expérience est beaucoup plus forte, ce qui explique qu'en soustrayant cette valeur de la teneur en glucose du sang total, il n'en reste plus pour les globules. Ensuite, quand l'auteur dose le sang oxalaté dont le volume globulaire est plus ou moins correctement évalué, le glucose « réapparaît » dans les globules. L'auteur explique ce phénomène en disant que l'oxalate modifie la perméabilité de la paroi globulaire vis-à-vis du glucose, conclusions qui nous paraissent mal fondées.

Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que Klinghoffer [403], en répétant les expériences d'Olmsted, n'ait pas pu en confirmer les résultats. La raison de cette divergence est simple, elle résulte de ce que Klinghoffer a pris soin de mesurer le volume globulaire pour chaque dosage.

Le rapport glucose globulaire/glucose plasmatique varie suivant les auteurs. Folin et Svedberg [51] et Folin et Andreen l'estiment égal, chez l'homme normal, à 0.6. Somogui [476, 477], Power et Ege à 0.7. Ces auteurs ont travaillé sur le sang additionné d'anticoagulants salins dont Ege en 1920 a fait ressortir l'influence sur les dosages du glucose. Le rapport devient plus élevé quand on dose le sang hépariné, par conséquent avec moins d'erreurs qu'avec les sels anticoagulants. Par ce procédé, Tremble et Maddock [487], Spannuth et Power [478] trouvent le rapport glucose globulaire/glucose plasmatique à 0.84. MacKay [421] en 1926 arrive sensiblement aux mêmes chiffres. En rapportant le glucose trouvé dans les deux phases sanguines à l'eau qui y est respectivement contenue, MacKay trouve que la concentration de ce

corps est la même dans l'eau globulaire et dans l'eau plasmatique. La répartition du glucose entre les deux phases se trouve donc régie par la simple diffusion dans l'eau à travers la paroi globulaire. Klinghoffer [103] d'une part, Neuwith [139] d'autre part, arrivent aux mêmes conclusions. D'après ces travaux, le rapport des concentrations du glucose dans l'eau globulaire et dans l'eau plasmatique est égal à 1 ou en est très près. Nous ne savons que très peu de chose sur la vitesse de diffusion du glucose à travers la membrane globulaire et sur la rapidité avec laquelle s'établit l'équilibre entre les globules et le plasma, quand survient un changement brusque de la concentration en glucose dans une des deux phases. Il importe donc en clinique d'éviter pour le dosage du glucose plasmatique ou globulaire l'emploi des anticoagulants. Pour étudier la répartition de ce corps, les dosages faits sur le sang des diabétiques additionné des sels anticoagulants, sont sujets à critique. Nous devons reconnaître que l'utilisation de plus en plus fréquente de l'héparine pour ce dosage, comme l'ont fait Brull [23], Power et Peterson [154], élimine en grande partie les causes d'erreurs.

RÉPARTITION DES CHLORURES ENTRE LES GLOBULES ET LE PLASMA. — Elle a fait l'objet d'innombrables travaux. Nous possédons toute une série d'observations au sujet de l'action des anticoagulants sur la répartition du chlore. Eisenman [44] en 1927, remarque que l'oxalate modifie la répartition des chlorures dans le sang, et que le plasma du sang oxalaté est ordinairement plus pauvre en chlorures que le sérum du sang défibriné. Il propose donc de toujours travailler sur le sang défibriné.

Guillaumin [66] en 1930, observe aussi que les anticoagulants salins agissent par dilution du plasma et que chacun d'eux possède une action spécifique. Avec le citrate tribasique, le chlore va vers les globules, avec le fluorure et l'oxalate il suit le chemin inverse. L'auteur conseille d'utiliser l'hirudine ou à défaut des doses minima d'anticoagulants. Laudat a fait les mêmes constatations. Les observations de Guillaumin sur le citrate ne sont pas confirmées par Raszeja

et Slavinsky [156] qui ne sont pas arrivés à constater le déplacement du chlore dans le sang citraté. Les deux auteurs polonais notent simplement une rétention du chlore par les globules dans le sang citraté ou additionné de doses faibles de chlorure de sodium. Par contre, dans le sang oxalaté, fluoré, ou mélangé à des doses plus fortes de chlorure de sodium, le passage du chlore entre les globules et le plasma se ferait librement.

Blitstein [16] a confirmé les observations d'Eisenman pour l'oxalate. D'après lui, le fluorure, le citrate et aussi le sulfate de zinc agissent de la même manière. Toutes ces substances ajoutées au sang diminuent le taux des chlorures plasmatiques par dilution du plasma. L'auteur conseille d'utiliser pour le dosage de chlorure l'héparine, l'hirudine ou le liquide qui, d'après lui, n'altéreraient pas le taux des chlorures plasmatiques. Cela n'est probablement pas tout à fait exact, car, nous l'avons vu pour les protéides, ces derniers anticoagulants faussent aussi les résultats mais à un moindre degré et quand on opère sur de faibles quantités de substances, il devient difficile de reconnaître l'erreur.

Malgré la publication de ces données précises sur l'influence des anticoagulants, on pratique les dosages de chlorures sanguins en se servant de l'oxalate, souvent sans en indiquer le taux. Wu [199], dans un travail important où il décrit plusieurs méthodes de dosage, indique que pour l'étude de la répartition des diverses substances entre les globules et le plasma, il faut utiliser le plasma du sang oxalaté, mais il n'indique point le taux à employer. D'après lui, le dosage pratiqué sur le plasma a plus de valeur au point de vue clinique que s'il l'est sur le sérum. Cette affirmation nous paraît excessive quand on utilise l'oxalate en poudre.

Tout ce que nous avons dit des chlorures s'applique, avec quelques modifications, aux autres constituants sanguins. La répartition de l'acide urique de l'azote peptidique et en général de l'azote non protéidique, s'étudie fréquemment sur le sang salifié. Comme on pouvait s'y attendre, les résultats de ces travaux sont rarement concordants. Wu [199], Folin et

Berglund [50], Folin et Svedberg [51], de Martens [131] ne donnent pas d'indications sur les doses d'anticoagulants utilisées. Pourtant dans ce groupe de corps entrent des substances à poids moléculaire élevé qui ne doivent pas être facilement diffusibles. De même, Lemeland et Deletang se servent [113], pour l'étude de glutathion dans les globules et le plasma, de sang fluoré, ce qui fausse notablement les résultats.

Les anticoagulants dans le dosage du phosphore amènent encore plus de troubles et provoquent des conclusions encore plus contradictoires. L'addition d'oxalate au sang n'altère pas la quantité de phosphore dosable d'après Barrenscheen, Doleschall et Popper [6]. Pour Lawaczek [109], la défibrination amène des perturbations importantes, contrairement à Barrenscheen, Doleschall et Popper. Tolstoï [185] trouve chez l'homme le taux de phosphore inorganique très voisin, que ce soit dans le plasma du sang oxalaté ou dans le sérum séparé trois heures après coagulation du sang. Buell observe une concordance assez bonne chez le chien entre les chiffres obtenus avec le plasma du sang non traité par les anticoagulants et avec le plasma du sang citraté, concordance qui fait défaut quand il emploie l'oxalate. Gaebler [56] n'observe pas davantage cette concordance, soit qu'il emploie l'oxalate, le fluorure ou le citrate et il l'explique par l'action diluante des anticoagulants.

Blitstein [16] n'obtient de bons résultats pour le dosage du phosphore inorganique que sur le plasma du sang liquoïdé. Tous les autres anticoagulants, oxalate, fluorure, citrate, héparine et hirudine fausseraient les résultats pour des raisons différentes.

Il est à remarquer que le dosage du phosphore se fait très souvent par les méthodes colorimétriques de Benedict et Theis [13], de Fiske et Subarrow [48], etc... Certains auteurs pensent que l'action des anticoagulants ne permet qu'un dosage très relatif par ce procédé en raison de l'inhibition de la réaction colorée qu'ils entraînent. Pour certains autres, cette inhibition ne se produit qu'avec des doses d'anticoagulants salins de beaucoup supérieures à celle qu'on utilise couramment.

Généralement, le dosage de calcium se fait simultanément avec celui du phosphore pour déterminer le rapport calcium/phosphore qui joue un rôle important dans le rachitisme. Ce que nous avons dit à propos du phosphore peut être répété pour le calcium, d'autant plus que ce dernier cation paraît peu diffusible à travers la paroi globulaire. Haag et Jones [68] ont pratiqué des dosages de calcium et de phosphore sur le bétail. Ils recueillent le sang dans une solution saturée de citrate de soude. D'autres, comme Robinson et Huffman [61], prennent des précautions excessives pour ne pas provoquer de stases veineuses, pour empêcher le départ de CO_2 en recueillant le sang sous huile de paraffine, tout cela pour éviter de modifier la répartition des ions, et ils ajoutent le citrate de lithium en poudre qui fausse les résultats beaucoup plus que ne pourrait le faire la stase veineuse ou la perte de CO_2 .

MAGNÉSIUM. — Eveleth [45] a étudié la répartition du magnésium entre le plasma et les globules dans le sang citraté à 3 p. 1.000. Dans ces conditions, la perturbation apportée par l'anticoagulant est assez faible ; il trouve, d'une façon générale, que les cellules rouges sont plus riches en magnésium que le plasma, sauf chez les veaux non sevrés. Ces résultats sont d'accord avec ceux d'Abderhalden [1], de Greenberg et ses collaborateurs [64, 65], de Green et Maskill. Dans tous ces travaux, les auteurs ont travaillé sur le plasma rendu incoagulable par divers sels et évidemment, l'eau s'est déplacée des globules vers le plasma. Si le magnésium se trouve sous forme peu diffusible dans les cellules, il est clair que les chiffres obtenus sont trop bas pour le plasma et au contraire trop élevés pour les globules. Donc, en réalité, la différence doit être moins grande que celle qui est indiquée par les auteurs.

Greenberg, Lucia, MacKay et Tufts [65] trouvent pour le magnésium globulaire des valeurs plus fortes que les auteurs précités. Malheureusement, il est impossible de comparer leurs résultats avec ceux des autres, car ils n'indiquent pas la méthode de préparation du plasma sanguin. Greenberg et

MacKay [64] donnent des chiffres sensiblement comparables pour le plasma et pour le sérum. Ils indiquent, de plus, que l'action de l'oxalate ne modifie pas les résultats, mais il ajoute celui-ci au sérum séparé du caillot, ce qui, dans ce cas, est de toute évidence. Travaillant aussi sur le plasma du sang oxalaté sans comparer les résultats obtenus avec ceux que pourrait donner du plasma non additionné d'anticoagulant, ils ne peuvent naturellement pas reconnaître l'action diluante de ce sel.

*
* *

Les quelques exemples que nous apportons indiquent que la question des anticoagulants n'a attiré que peu ou pas l'attention des travailleurs et que, par suite, les résultats obtenus sur le sang additionné de fortes doses salines doivent être accueillis avec circonspection.

Cependant, depuis quelques années ce problème commence à être de plus en plus étudié. L'apparition récente de nouveaux anticoagulants tels que l'héparine permet heureusement d'éviter les erreurs grossières qu'entraînent constamment les anticoagulants salins. Il est regrettable que cet excellent anticoagulant ne convienne pas pour certains dosages, notamment, comme l'indique Fischer, pour la séparation des différentes fractions protéidiques.

CONCLUSIONS

1° Le plasma du sang additionné de divers anticoagulants en poudre, oxalate, citrate, fluorure, héparine, liquoïde, hirudine, présente une diminution de protéïdes par rapport au plasma obtenu par centrifugation du sang non traité.

2° Le sang humain et le sang de divers animaux : lapin, mouton, poule, répondent sensiblement de la même façon.

3° L'intensité de la diminution observée est en rapport avec la quantité de substance utilisée. Il existe de légères variations suivant l'espèce et dans une même espèce entre les individus.

4° Les anticoagulants en solution hypertonique agissent de même. L'héparine, anticoagulant très puissant, qui, utilisé à des doses très faibles en solution, n'amène pas une diminution appréciable des protéïdes plasmatiques.

5° Les autres constituants du sang tels que le glucose accusent aussi, dans le sang traité, une diminution du même ordre de grandeur que celle des protéïdes.

6° Cette diminution, sauf pour le liquoïde, ne se produit qu'en présence des globules rouges. Le taux des protéïdes du plasma additionné d'anticoagulant après soustraction des globules, reste constant

Le plasma peut être remplacé par le sérum et les globules rouges par des levures, sans que les résultats changent.

7° Cette diminution des protéïdes observée dans le plasma du sang traité, n'est pas due à une précipitation des protéïdes par l'anticoagulant, sauf pour le liquoïde, mais à la dilution du plasma par l'eau venue des globules rouges.

8° C'est la concentration moléculaire qui régit la répartition d'eau entre les globules et le plasma. Quand on augmente la concentration moléculaire du plasma, l'eau se dirige des globules rouges vers le plasma et les protéïdes comme les autres constituants du plasma se trouvent dilués. Quand, au

contraire, on diminue la concentration moléculaire du plasma, le phénomène inverse se produit, l'eau passe du plasma vers les globules et le plasma se concentre.

9° L'addition au sang d'un anticoagulant en poudre ou en solution hypertonique provoque la diminution du volume globulaire. Cette diminution est due au départ d'eau des globules.

10° La quantité de protéides dans un volume déterminé de sang reste constante quand on ajoute un anticoagulant en solution ou en poudre. Le volume plasmatique augmentant, on comprend qu'il y ait une diminution apparente des protéides quand on dose ceux-ci sur une quantité déterminée dans le plasma. Mais on peut ramener par des calculs les résultats à une exactitude assez satisfaisante, en tenant compte du volume globulaire et du taux apparent des protéides plasmatiques. Cela est aussi exact pour d'autres constituants sanguins peu diffusibles.

11° La finesse de la paroi globulaire facilite le phénomène d'osmose entre les globules rouges et le plasma additionné de diverses substances, et l'équilibre s'établit très rapidement, en quelques minutes au plus. Aussi les globules rouges jouent un rôle important dans le maintien de la concentration moléculaire du sang.

12° L'étude de la dilution des constituants plasmatiques après addition au sang de différentes substances, permet de vérifier indirectement la perméabilité de la paroi globulaire aux différents ions ou aux diverses molécules.

13° La perméabilité globulaire est régie par la concentration en ions hydrogène. Elle croît avec l'acidification du milieu, passe par un minimum au voisinage de pH 8,3 et s'élève lentement en milieux plus alcalins. Certains corps tels que l'urée, traversent facilement la paroi globulaire indépendamment du pH du milieu.

14° L'eau des globules rouges osmotiquement libre est égale dans les milieux plus ou moins isotoniques à 60-66 p. 100 du volume globulaire.

15° Au point de vue pratique, il ressort qu'il y a lieu d'appliquer les règles suivantes au dosage des protéides :

a) **TAUX RÉEL DES PROTÉIDES DANS LE PLASMA.** — Il ne peut être déterminé que sur le plasma frais obtenu par centrifugation rapide d'un sang qui n'est additionné d'aucune substance ou avec une très légère erreur sur le plasma du sang additionné d'héparine en solution de 0,5 à 2,5 p. 100 à raison de 100 à 450 milligrammes par litre.

b) **TAUX DES PROTÉIDES PLASMATIQUES DANS LE SANG TOTAL.** — Les dosages pratiqués sur le plasma du sang additionné d'anticoagulants en poudre ou en solution, ne peuvent être calculés que d'après le volume du sang total en raison de la dilution plasmatisque produite par l'exosmose globulaire. Pour cela, il faut déterminer le volume globulaire. Quels que soient l'anticoagulant et la forme sous laquelle ce dernier a été utilisé, on trouve alors toujours pour un même sang, des valeurs très voisines.

16° Le taux total des protéides reste constant dans le sérum séparé du caillot de deux à vingt-quatre heures après la coagulation du sang.

17° Le sérum provenant du sang total est plus pauvre en protéides que le sérum obtenu par coagulation du plasma du même sang.

18° La diminution de la concentration en protéides du sérum par rapport au plasma reconnaît deux causes :

a) L'élimination de la fibrine.

b) La dilution du sérum par l'eau globulaire.

19° C'est le départ de l'acide carbonique du sang qui régit le passage d'eau globulaire dans le milieu environnant au moment de la coagulation.

20° On peut doser la fibrine avec précision par différence entre le plasma séparé des globules par simple centrifugation et le sérum provenant de ce même plasma.

21° Les résultats des dosages faits soit sur les globules, soit sur le plasma provenant du sang additionné de fortes doses d'anticoagulants salins, doivent être accueillis avec beaucoup de circonspection. Le chapitre de la répartition de différents corps entre le plasma et les globules est à reviser.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Régulation de la concentration
des protéïdes dans le plasma.

VU ET APPROUVÉ LE 22 AVRIL 1939 :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABDERHALDEN (E.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, **25**, 1898, p. 65.
- [2] ARTHUS (M.) et PAGÈS (C.). *Arch. de Physiol.*, 1890, p. 739.
- [3] ARTHUS (M.). *La coagulation du sang*. G. Carré et G. Naud, édit., Paris, 1897.
- [4] ASHBY (W.). *Amer. Journ. Physiol.*, **68**, 1924, p. 585 et 611.
- [5] BARNETT (C. W.), JONES (R. B.) et COHN (R. B.). *Journ. Exp. Med.*, **55**, 1932, p. 683.
- [6] BARRENSCHEEN (H. K.), DOLESCHALL (F.) et POPPER (L.). *Biochem. Zeitschr.*, **177**, 1926, p. 39.
- [7] BAYLISS (L. E.) et FEE (A. R.). *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 60.
- [8] BELLIS (C. J.) et SCOTT (F. H.). *Proc. Soc. Exer. Biol. and Med.*, **29**, 1932, p. 1105.
- [9] BELLIS (C. J.) et SCOTT (F. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **111**, 1935, p. 17.
- [10] BEHRING (E.). *Münch. med. Wochenschr.*, **58**, 1911, p. 655.
- [11] BENEDICT (S. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 141.
- [12] BENEDICT (S. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 161.
- [13] BENEDICT (S. R.) et THEIS (R. C.). *Journ. Biol. Chem.*, **61**, 1924, p. 63.
- [14] BERTRAND (G.). *C. R. du Lab. de Carlsberg. Sér. Chim.*, **22**, 1938, p. 67.
- [15] BING (J.). *Acta Med. Scand.*, **86**, 1935, p. 367.
- [16] BLITSTEIN (I.). *Revue Belge des Sciences Méd.*, **7**, 1935, p. 69.
- [17] BLIX. *Biochem. Zeitschr.*, **74**, 1916, p. 302.
- [18] BODANG (A.). *Arch. experim. Path. u. Pharmak.*, **52**, 1905, p. 242.
- [19] BORCHART (W.). *Arch. f. Schiffs. und Trop. Hyg.*, **34**, 1930, p. 327.
- [20] BORDET (J.) et GENGOU. *Annales de l'Institut Pasteur*, **15**, 1901, p. 129.
- [21] BRODIN (P.), RICHET (C.) et SAINT-GIRONS (F.). *Journ. de Physiol. et de Path. Génér.*, **18**, 1919-20, p. 8.
- [22] BRUGER (M.) et POINDEXTER (C. A.). *Journ. Biol. Chem.*, **101**, 1933, p. 21.
- [23] BRULL (L.). *Arch. Intern. Physiol.*, **32**, 1930, p. 138.
- [24] BUELL (M. V.). *Journ. Biol. Chem.*, **56**, 1923, p. 97.
- [25] CAPPS. Cité d'après Ponder et Saslow.
- [26] CHERBULIEZ (A.). *Ann. de Physiol. et de Physicochim. Biol.*, **1**, 1925, p. 25.
- [27] CHRISTENSEN (J.) et WARBURG (E. J.). *Acta med. Scand.*, **70**, 1929, p. 286.
- [28] COLLIP (J.-B.). *Journ. Biol. Chem.*, **42**, 1920, p. 227.
- [29] CONKLIN (R. E.). *Amer. Journ. Physiol.*, **95**, 1930, p. 79, 91 et 98.
- [29 bis] CULBERTSON (J. T.). *Amer. Journ. Physiol.*, **107**, 1934, p. 120.
- [30] CULLEN (G. F.) et VAN SLYKE (D. D.). *Journ. Biol. Chem.*, **41**, 1920, p. 587.
- [31] CUTTING (W. C.) et CUTTER (R. D.). *Amer. Journ. Physiol.*, **113**, 1935, p. 150 et **114**, p. 204

- [32] DAVIS (J. E.) et BREWER (N.). *Amer. Journ. Physiol.*, **113**, 1935, p. 586.
- [33] DAVSON (H.) et PONDER (E.). *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 756.
- [34] DAVSON (H.). *Journ. Cellular and Comp. Physiol.*, **10**, 1937, p. 247.
- [35] DAVSON (H.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 676.
- [36] DAVSON (H.). *Biochem. Journ.* **30**, 1936, p. 391.
- [37] DELEZENNE. *C. R. Soc. Biol.*, 1896, p. 782; 1897, p. 462 et *Arch. de Physiol.*, 1897.
- [38] DENIS (W.) et MEYSENBERG (L.). *Journ. Biol. Chem.*, **71**, 1926, p. 587.
- [39] DRESEL (K.) et LEITNER (Z.). *Zeitschr. klin. Med.*, **3**, 1929, p. 394.
- [40] DREYER (G.) et RAY (W.). *Journ. Path. and Bact.*, **13**, 1909, p. 344, et **17**, 1912, p. 143.
- [41] EGE (R.). *Biochem. Zeitschr.*, **115**, 1921, p. 88; **130**, 1922, p. 99, et **134**, 1923, p. 234. *Biochem. Journ.*, **21**, 1927, p. 967. *Amer. Journ. Physiol.*, **72**, 1925, p. 76.
- [42] EGE (R.). *Biochem. Zeitschr.*, **3**, 1920, p. 189.
- [43] EGE (R.) et ROCHE (J.). *Skand. Arch. Physiol.*, **59**, 1930 p. 75.
- [44] EISENMAN (A. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **71**, 1926, p. 587.
- [45] EVELETH (D. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **119**, 1937, p. 289.
- [46] FALTA et RICHTER-QUITNER (M.). *Biochem. Zeitschr.*, **114**, 1921, p. 144.
- [47] FELDMANN (T. N.) et ULANOVSLAJA. *Acta Med. Scand.*, **87**, 1935, p. 65.
- [48] FISKE (C. H.) et SUBBAROW (Y.). *Journ. Biol. Chem.*, **66**, 1925, p. 375.
- [49] FOLIN (O.). *Journ. Biol. Chem.*, **77**, 1928, p. 421 ; **81**, 1929, p. 231 ; **83**, p. 115; **82**, p. 83; **86**, 1930, p. 173 et 179.
- [50] FOLIN (O.) et BERGLUND (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 395.
- [51] FOLIN (O.) et SVEDBERG (A.). *Journ. Biol. Chem.*, **70**, 1926, p. 421.
- [52] FONTÈS (G.) et THIVOLLE (L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1927, p. 353. *C. R. Soc. Biol.*, **100**, 1929, p. 1196 et 1198.
- [53] FOSTER (D. P.) et WHIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **58**, 1922, p. 365, 379 et 407.
- [54] FREDERICIA (L. S.). *Journ. Biol. Chem.*, **42**, 1920, p. 245.
- [55] FREUD. Cité d'après Gilbert et Weinberg.
- [56] GAEBLER (O. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **99**, 1932, p. 99.
- [57] GARDNER (J. A.), GAINSBOROUGH (H.) et MURRAY (R.). *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 1457.
- [58] GELLHORN (E.) et RÉGNIER (J.). *La perméabilité en physiologie et en pathologie générale*. Masson, édit., Paris, 1936.
- [59] GETTLER (A. O.) et BAKER (W.). *Journ. Biol. Chem.*, **25**, 1916, p. 211.
- [60] GILBERT (A.) et WEINBERG (M.). *Traité du Sang*. Baillière et Fils, édit., Paris, 1910.
- [61] GOUGH (A.). *Biochem. Journ.*, **18**, 1923, p. 202.
- [62] GRAM (H. C.). *Journ. Biol. Chem.*, **44**, 1921, p. 297.
- [63] GREEN. *Journ. of Physiol.*, **8**, 1888, p. 354.
- [64] GREENBERG (D. M.) et MACKAY (M. A.). *Journ. Biol. Chem.*, **96**, 1932, p. 419.

- [65] GREENBERG (D. M.), LUCIA (S. P.), MACKEY (M. A.) et TUFTS (E. V.). *Journ. Biol. Chem.*, **100**, 1933, p. 139.
- [66] GUILLAUMIN (Ch. O.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, 1930, p. 491.
- [67] GÜRBER. *Jahresber. Forsch. Thierchem.*, **25**, 1895, p. 165.
- [68] HAAG (J. R.) et JONES (J. R.). *Journ. Biol. Chem.*, **110**, 1935, p. 439.
- [69] HALDANE (J. S.) et PRIESTLEY (J. G.). *Journ. of Physiol.*, **50**, 1916, p. 297.
- [70] HALVERSON (J. O.), MOHLER (H. K.) et BERGEIM (O.). *Journ. Biol. Chem.*, **32**, 1917, p. 171.
- [71] HAMBURGER (H. J.). *Arch. f. Physiol.*, 1893, Suppl., p. 153.
- [72] HAMBURGER (H. J.). *Arch. Anat. u. Physiol.*, 1892, p. 513 et 1898, p. 317.
- [73] HAMBURGER (H. J.). *Biochem. Zeitschr.*, **86**, 1918, p. 309.
- [74] HAMBURGER (H. J.) et BUBANOVIC. *Arch. Inter. Physiol.*, **4**, 1910, p. 10.
- [75] HAMBURGER (H. J.). *Wien. Med. Wochenschr.*, **66**, 1916, p. 519 et 575.
- [76] HAMMERSTEN (O.). *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **22**, 1876, p. 333. et *A. g. P.*, **14**, 1876, p. 211.
- [77] HAMPSON et MAIZELS. *Journ. of Physiol.*, **62**, 1927-28, p. 16.
- [78] HARRIS (D. T.). *Brit. Journ. Exper. Path.*, **1**, 1920, p. 142.
- [79] HASTINGS (A. B.) et SENDROY (J.). *Journ. Biol. Chem.*, **76**, 1928, p. 565.
- [80] HASTINGS (A. B.) et VAN DYKE (H. B.). *Journ. Biol. Chem.*, **92**, 1931, p. 13.
- [81] HAWCRAFT (J. B.). *Arch. f. experim. Path. u. Pharmak.*, **18**, 1884, p. 209.
- [82] HEILMEYER (L.). *Biochem. Zeitschr.*, **212**, 1929, p. 430.
- [83] HENDERSON (L. J.). *Le Sang*. Edit. « Presses Universitaires », Paris, 1931.
- [84] HEMINGWAY (A.), COLLINS (D. A.) et BERNHART (F.). *Amer. Journ. Physiol.*, **117**, 1936, p. 102.
- [85] HOWE (P. E.). *Physiol. Rev.*, **5**, 1925, p. 439.
- [86] HOWELL (W.). *Amer. Journ. Physiol.*, **63**, 1922-23, p. 434 et **71**, 1924-25, p. 553.
- [87] HEWSON. Cité d'après le *Dictionnaire de Physiologie* de C. Richet. F. Alcan, édit., Paris, 1898.
- [88] HÖBER (R.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **7**, 1936, p. 367.
- [89] HÖGLER (F.) et THOMANN (A.). *Biochem. Zeitschr.*, **209**, 1929, p. 1.
- [90] HOLMAN (L.), MAHONEY (E. B.) et WHIPPLE (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, **59**, 1934, p. 251.
- [91] HOOPER (C. W.), SMITH (H. P.), BELT (A. E.) et WHIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **51**, 1920, p. 205.
- [92] JACOBS (M. H.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **3**, 1933, p. 29.
- [93] JACOBS (M. H.) et PARPART (A. K.). *Biol. Bull.*, **65**, 1933, 512.
- [94] JACOBS (M. H.), GLASSMANN (H. N.) et PARPART (A. K.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.* **7**, 1935, p. 197.
- [95] JACOBS (M. H.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **4**, 1934, p. 161.
- [96] JACOBS (M. H.). *Biol. Bull.*, **67**, 1934, p. 325.

- [97] JACOBS (M. H.) et PARPART (A. K.). *Biol. Bull.*, **63**, 1932, p. 224.
- [98] JENKINS (C. E. A.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **43**, 1932, p. 127.
- [99] JONES (T. B.) et SMITH (P. H.). *Amer. Physiol.*, **94**, 1930, p. 144.
- [100] KEITH, ROWNTREE et GERAGHTY. *Arch. Inter. Med.*, **61**, 1916, p. 547.
- [101] KERR. *Journ. Biol. Chem.*, **85**, 1929, p. 47.
- [102] KERR (W. J.), HURWITZ (S. H.) et WIPPLE (G. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **47**, 1918, p. 370.
- [103] KLINGHOFFER (K. A.). *Amer. Journ. Physiol.*, **118**, 1937, p. 431.
- [104] KÖPPE. *Pflüger Arch.*, **107**, 1905, p. 86.
- [105] KREVISKY (C.). *Biochem. Journ.*, **24**, 1930, p. 815.
- [106] KYLIN (E.). *Acta Med. Scand.*, **83**, 1934, p. 347.
- [107] KYLIN (E.) et KRISTENSON. *Acta Med. Scand.*, **83**, 1934, p. 273.
- [108] KYLIN (E.). *Acta Med. Scand.*, **84**, 1934, p. 73.
- [109] LAWACZECK (H.). *Biochem. Zeitschr.*, **145**, 1924, p. 351.
- [110] LEENDERTZ et GROMELSKY. Cité d'après Starlinger.
- [111] LEHMAN (W.) et SCOTT (F. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **111**, 1935, p. 43.
- [112] LEICHSERING (J. M.), BIESTER (A.), HÖNIG (H. H.), FURNAS (S. M.), FOSS (E. S.) et ROUTT (M. V.). *Amer. Journ. Physiol.*, **99**, 1932, p. 391.
- [113] LEMELAND (J.) et DELETANG (R.). *G. R. Soc. Biol.*, **115**, 1934, p. 1518.
- [114] LESTER. Cité d'après Starlinger.
- [115] LEVY (M.), MIGNON (S.) et HAFNER (B.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1938, p. 145 et 305.
- [116] LILJENFELD. Cité d'après Gilbert et Weinberg.
- [117] LIMBECK. *Arch. f. exper. Path.*, **35**, 1894, p. 309.
- [118] LINDER (G. C.), LUNDSGAARD (C.) et VAN SLYKE (D. D.). *Journ. Exper. Med.*, **39**, 1924, p. 887.
- [119] LINZENMEIER. *Pflüger Arch. f. d. ges. Physiol.*, **186**, 1921, p. 272.
- [120] LUMIÈRE (A.) et COUTURIER (H.). *G. R. Soc. Biol.*, **94**, 1926, p. 1166.
- [121] MACKAY (E. M.). *Journ. Biol. Chem.*, **97**, 1932, p. 685.
- [122] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **77**, 1933, p. 181.
- [123] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **86**, 1936, p. 147.
- [124] MACLEOD (J.) et PONDER (E.). *Amer. Journ. Physiol.*, **111**, 1935, p. 655.
- [125] MAG LEAN et MAC LEAN. Cité d'après Man et Guildea.
- [126] MADDEN (S. C.), GEORGE (W. E.), WARAICH (G. S.) et WHIPPLE (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, **65**, 1937, p. 279 et 437 ; **67**, 1938, p. 675.
- [127] MAIZELS (M.). *Biochem. Journ.*, **29**, 1935, p. 1970.
- [128] MAIZELS (M.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 337.
- [129] MAIZELS (M.). *Biochem. Journ.*, **27**, 1933, p. 33.
- [130] MAN (E. R.) et GUILDEA (E. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **99**, 1933, p. 43.
- [131] MARTENS (R.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1928, p. 1336.
- [132] MARX (H.) et MOHR (W.). *Arch. Exper. Path. Pharmac.*, **156**, 1930, p. 105.
- [133] MATHEWS. *Physiol. Chemistry*. W. Woodland Co, édit., New-York, 1925.
- [134] MILLAR. *Quart. Journ. Exp. Physiol.*, **15**, 1929, p. 187.
- [135] MOORE (B.) et ROAF (H. F.). *Biochem. Journ.*, **3**, 1907, p. 55.
- [136] MOORE (N. S.) et VAN SLYKE (D. D.). *Journ. Clin. Invest.*, **8**, 1930, p. 337.

- [137] MOND (R.). *Pflüger Arch.*, **217**, 1927, p. 618 ; **219**, 1928, p. 467 ; **226**, 1935, p. 153, et *Arch. Ges. Physiol.*, **217**, 1927, p. 618.
- [138] NEUHAUSEN (B. S.) et BRESLIN (J.-E.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **34**, 1923, p. 199.
- [139] NEUWITH. *Journ. Biol. Chem.*, **117**, 1936, p. 335.
- [140] NYGAARD (K.-K.), WILDER (M.) et BERKSON (J.) *Amer Journ. Physiol.*, **114**, 1935, p. 128.
- [141] OLMSTED (J. M. D.). *Amer Journ. Physiol.*, **111**, 1935, p. 551 et **114**, 1936, p. 488.
- [142] PARPART (A. K.) et SCHULL (J. C.). *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, **6**, 1935, p. 137.
- [143] PETERS (J. P.), EISENMAN (A. J.) et BULGER (H. A.). *Journ. Clin. Invest.*, **4**, 1925, p. 435.
- [144] PFEIFFER et KOSTER. Cités d'après Starlinger.
- [145] PICKERING (J. W.). *The blood plasma in health and disease*. Mac Millan Co, Edit., New-York, 1929.
- [146] POMMERENKE (W. T.), SLAVIN (H. B.), KARIHER (D. H.) et WHIPPLE (G. H.). *Journ. Exper. Med.*, 1935, p. 261 et 383.
- [147] PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **83**, 1935, p. 34.
- [148] PONDER (E.). *Journ. of Physiol.*, **85**, 1935, p. 439.
- [149] PONDER (E.) et ROBINSON (E. J.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 1940, et *Journ. of Physiol.*, **83**, 1935, p. 352.
- [150] PONDER (E.) et SASLOW. *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 18 et 169 et **73**, 1931, p. 267.
- [151] PONDER (E.) et SASLOW (G.). *Quart. Journ. Exper. Physiol.*, **19**, 1929, p. 319.
- [152] PORGÈS et SPIRO. Cités d'après Starlinger.
- [153] POWERS (J. H.), BOWIE (M. A.) et HOWARD (J. M.). *Amer. Journ. Physiol.*, **92**, 1930, p. 665.
- [154] POWER (M. H.) et PETERSON (R.). *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **28**, 1931, p. 548.
- [155] PRIESTLEY (J. G.). *Journ. of Physiol.*, **50**, 1916, p. 304 et **55**, 1921, p. 305.
- [156] RASZEJA (S.) et SLAVINSEY (M. A.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 1933, p. 1569 et **16**, 1934, p. 1692.
- [157] REICHE (F.) et FRETWURST (F.). *Beitr. klin. Tuberkulose* **72**, 1929, p. 484.
- [158] RICHTER-QUITTNER. *Biochem. Zeitschr.*, **95**, 1919, p. 179.
- [159] RINGER (S.) et SAINSBURY (H.). *Journ. of Physiol.*, **11**, 1890, p. 369.
- [160] RIOCH (D.). *Journ. of Physiol.*, **70**, 1930, p. 45.
- [161] ROBINSON (C. S.) et HUFFMAN (C. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **67**, 1926, p. 245.
- [162] ROSENBERG (H.), SRIFFERT (R. W.), KALENSCHER (H.) et WITTHOLZ. *Arch. Wissenschaftl. u. Prakt. Tierheilk.*, **60**, 1929, p. 489.
- [163] ROSSDALE (G.). *Quart. Journ. Med.*, **16**, 1922, p. 245.
- [164] SAINT-RAT (L.) et RONFAUT (J.). *Bull. Sciences Pharmacol.*, **27**, 1920, p. 289.
- [165] SCHIODT (E.). *Biochem. Journ.*, **25**, 1931, p. 8.
- [166] SCHMIDT (A.). *Zur Blutlehre*, 1892, et *Weitere Beiträge zur Blutlehre*, 1895.

- [167] SCHMIDT (L. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **109**, 1935, p. 449.
- [168] SCHMIDT (A. A.) et TULJTSCHINSKAJA (K.). *Zeitschr. Ges. exp. Med.*, **90**, 1933, p. 150.
- [169] SCHULTZ (E. W.), NICHOLAS (J. K.) et SCHAEFFER (J. H.). *Amer. Journ. Physiol.*, **1**, 1925, p. 101.
- [170] SCHÜRER (J.). *Arch. exper. Path. u. Pharmak.*, **66**, 1911, p. 171.
- [171] SCOTT (F. H.). *Journ. of Physiol.*, **50**, 1916, p. 128.
- [172] SLAVINSKY (A.). *Biochem. Journ.*, **27**, 1933, p. 356.
- [173] SMIRK (F. H.). *Journ. Physiol.*, **75**, 1932, p. 81 ; *Journ. Exper. Path.*, **9**, 1928, p. 81 ; *Biochem. Journ.*, **21**, 1927, p. 31 et 36 et **22**, 1928, p. 739.
- [174] SMITH (H. P.). *Amer. Journ. Physiol.*, **51**, 1920, p. 221.
- [175] SNAPPER (J.). *Proc. Roy. Soc. Med.*, **24**, 1931, p. 1371.
- [176] SOMOGYI (M.). *Journ. Biol. Chem.*, **90**, 1931, p. 731 et **78**, 1928, p. 117.
- [177] SOMOGYI (M.). *Journ. Biol. Chem.*, **103**, 1933, p. 665.
- [178] SPANNUTH (J. R.) et POWER (M. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **93**, 1931, p. 343.
- [179] SPERRY (W. M.) et SCHOENHEIMER. *Journ. Biol. Chem.*, **110**, 1935, p. 655.
- [180] STARLINGER (W.). *Biochem. Zeitschr.*, **140**, 1923, p. 203 et **143**, p. 179.
- [181] STRÖM (J.). *Acta Med. Scand.*, **96**, 1938, p. 365.
- [182] SWANSON (P. P.) et SMITH (A. H.). *Journ. Biol. Chem.*, **97**, 1932, p. 745.
- [183] SWEDIN (B.). *Biochem. Zeitschr.*, **257**, 1933, p. 411.
- [184] TODD (C.) et WHITE (R. G.) et ASHBY. *Proc. Roy. Soc.*, **84**, 1912, p. 255.
- [185] TOLSTOI (E.). *Journ. Biol. Chem.*, **55**, 1923, p. 157.
- [186] TOMPSETT (S. L.). *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 1544.
- [187] TREMBLE (H. C.) et MADDOCK (S. J.). *Journ. Biol. Chem.*, **78**, 1928, p. 323.
- [188] VAN SLYKE (D. D.) et CULLEN (G. F.). *Journ. Biol. Chem.*, **30**, 1917, p. 289.
- [189] VAN SLYKE (D. D.), WU (H.) et MAC LEAN. *Journ. Biol. Chem.*, **56**, 1923, p. 765.
- [190] VARS (H. M.). *Amer. Journ. Physiol.*, **93**, 1930, p. 554.
- [191] WAKEMAN, EISENMAN (A. J.) et PETERS (J. P.). *Journ. Biol. Chem.*, **73**, 1927, p. 567.
- [192] WALKER (A.). *Journ. Biol. Chem.*, **101**, 1933, p. 269.
- [193] WANG (C. C.) et FELSHER (A. R.). *Journ. Lab. and Clin. Med.*, **10**, 1925, p. 269.
- [194] WARBURG (E. J.). *Biochem. Journ.*, **16**, 1922, p. 153.
- [195] WEECH (H. A.), REEVERS (E. B.) et GOETTSCHE (E.). *Journ. Biol. Chem.*, **113**, 1936, p. 167.
- [196] WESTERGREN (A.), JUHLIN-DAUNFELT (C.) et SCHNELL (R.). *Acta Med. Scand.* **50**, 1930, p. 307.
- [197] WILANDER (O.). *Acta Med. Scand.*, **94**, 1938, p. 258.
- [198] WU (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 33.
- [199] WU (H.). *Journ. Biol. Chem.*, **51**, 1922, p. 21.

38958. — ANCR^e IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, rue Cassette, Paris. — 1939.
